Replikation doppelsträngiger DNA des Bakteriophagen M13 in vitro und die Effekte des Escherichia coli HD-Proteins sowie des M13 Gen 5-Proteins auf die Replikation

P. Schneck

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

1979

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Abteilung für Virusforschung
Direktor Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider

Replikation doppelsträngiger DNA des Bakteriophagen M13 in vitro und die Effekte des Escherichia coli HD-Proteins sowie des M13 Gen 5-Proteins auf die Replikation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Schneck
aus München
München, im April 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.1979

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0037

Inhaltsverzeichnis:

		Seite
Zusammenfassung		1
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen		3
1.	Einleitung	5
1.1.	Allgemeiner Teil	5
1.2.	Spezieller Teil	6
1.2.1.	Die Bakteriophagen	6
1.2.2.	Die einzelsträngigen DNA-Phagen ØX174 und M13	7
1.2.3.	Der DNA-Replikationszyklus von M13	10
1.2.4.	Spezielle Fragestellung	14
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Materialien	16
2.1.1.	Bakterienstämme und Bakteriophagen	16
2.1.2.	Nährmedien, Nährböden und Puffer	16
2.1.3.	Chemikalien	18
2.1.4.	Enzyme und andere Proteine	18
2.1.5.	Filter und Folien	19
2.2.	Methoden	20
2.2.1.	Phagenzucht	20
2.2.2.	Isolierung und Reinigung ^{32}P-markierter M13 Einzelstrang DNA und RFI DNA	20
2.2.3.	Isolierung und Reinigung von M13 Einzelstrang-DNA und RFI-DNA im präparativen Maßstab	21
2.2.4.	Zentrifugationstechniken	22
2.2.5.	TCA-Fällung und Messung der Radioaktivität	23
2.2.6.	Analytische Agarose-Gele	23
2.2.7.	Herstellung der in vitro Systeme	23
2.2.8.	Inkubationsansätze	25
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Experimente mit permeabilisiertem Zellsystem	27
3.1.1.	DNA-Synthese in Toluol-behandelten Zellen und im plasmolysierten Zellsystem	27

Seite

3.1.2. Charakterisierung des Hemmeffekts von Novobiocin 30

3.1.3. Zusammenfassung der bisherigen Resultate 38

3.2. Das Cellophanfoliensystem 38

3.2.1. Test des Membranfoliensystems nach Schaller für die RF-Replikation von M13 38

3.2.2. Konzentrierung von Extrakten aus M13 am5 infizierten Zellen auf Membranfolien 39

3.2.3. Charakterisierung des Systems 41

3.2.4. Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation im neutralen CsCl-EtBr-Gradienten 44

3.2.5. Bandsedimentation Hind II verdauter Produkte in alkalischen CsCl-Gradienten 46

3.2.6. Strangtrennung durch Gleichgewichtszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten 48

3.2.7. Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten nach Dichtemarkierung mit BrdUTP 52

3.2.8. Effekt von NMN auf die Replikation 54

3.2.9. Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.2. 56

3.3. Das lösliche System 56

3.3.1. DNA-Synthese in Extrakten aus uninfizierten sowie M13 am5 infizierten E.coli 159 Zellen 56

3.3.2. Einbaukinetik in Gegenwart des E.coli HD-Proteins 60

3.3.3. Effekte des M13 Gen 5-Proteins 62

3.3.4. Konzentrationsabhängigkeit der Effekte des Gen 5- und E.coli HD-Proteins sowie Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP in Gegenwart von E.coli HD-Protein und M13 Gen 5-Protein 64

3.3.5. Effekte verschiedener Hemmer auf die in Gegenwart von Gen 5-Protein ablaufende Synthese 66

3.3.6. Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten 66

3.3.7. Analyse der in Gegenwart von E.coli HD-Protein bzw. M13 Gen 5-Protein synthetisierten Produkte durch Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten 68

3.3.8. Kombinierte Zugabe von M13 Gen 5-Protein und E.coli HD-Protein zu Extrakten aus M13 am5 infizierten Zellen 68

3.3.9. Einzelstrangsynthese im löslichen System 71

3.3.10. Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.3. 75

		Seite
4.	Diskussion	76
5.	Literaturverzeichnis	81
	Danksagung	86
	Lebenslauf	87

Zusammenfassung

Durch die Entwicklung einer neuen Methode, mit der äußerst konzentrierte Extrakte aus M13 am5 infizierten E.coli Zellen hergestellt werden konnten, gelang erstmalig die in vitro Replikation doppelsträngiger M13 DNA.
Im wesentlichen wurden dabei Extrakte aus phageninfizierten Zellen auf ausgestanzten Plättchen aus Einmachfolie, welche auf einer Agarplatte fixiert waren, unter einem kalten Luftstrom angetrocknet. Die so präparierten Plättchen wurden dann auf einen Inkubationstropfen transferiert und in einem Wasserbad inkubiert. Mit Hilfe verschiedener Zentrifugationsmethoden, wie der Sedimentations- und Gleichgewichtszentrifugation in neutralen und alkalischen CsCl-Gradienten, wurden die Produkte analysiert. Zusätzlich wurden spezifische Hemmer der DNA-Replikation, wie Nalidixinsäure, Oxolinsäure, Novobiocin u.a., zur Charakterisierung der einzelnen Syntheseschritte herangezogen.

Es konnte damit der Nachweis dafür erbracht werden, daß das verwendete in vitro System nicht nur die endogenen M13 Replikationsintermediate zu Ende replizieren konnte, sondern darüber hinaus zur Initiation neuer Replikationsrunden in der Lage war.
Ferner konnte gezeigt werden, daß Extrakte aus M13 am5 infizierten E.coli Zellen nach Zugabe von E.coli HD-Protein ebenfalls zur effizienten Replikation endogener M13 RF-DNA in der Lage sind: Die Ergebnisse der entsprechenden Produktanalyse bewiesen, daß mindestens zwei Replikationsrunden im "löslichen System" durchlaufen wurden.
Parallel dazu wurde in diesem System der Effekt des M13 Gen 5-Proteins auf die M13 RF-Replikation studiert. In Abhängigkeit von der Menge zugegebenen Gen 5-Proteins konnte die Synthese beider DNA-Stränge stimuliert bzw. die Synthese des Komplementärstrangs selektiv und vollständig gehemmt werden. Das heißt, durch die Zugabe von Gen 5-Protein konnte das System von RF-Replikation auf Einzelstrangsynthese umgeschaltet werden.
Das E.coli HD-Protein hatte in vitro sowohl auf die Syntheserate in Abwesenheit (RF-Replikation), als auch in Gegenwart von M13 Gen 5-Protein (Einzelstrangsynthese) einen stark stimulierenden Effekt. Damit wurde die, bereits bei der M13 in vitro Einzelstrang zu Doppelstrang-Umwandlung (im rekonstituierten System) gezeigte, essentielle Rolle dieses Proteins auch für die beiden anderen Replikationsschritte von M13 demonstriert.

Damit besteht erstmalig die Möglichkeit, M13 RF-Replikation und M13 SS-Synthese scharf voneinander abgegrenzt in vitro untersuchen zu können. Ein weiterer und wesentlicher Vorteil dieses in vitro Systems liegt - im Gegensatz zu anderen, wie dem plasmolysierten oder toluolbehandelten Zellsystem - in seiner Fraktionierbarkeit und somit Komplementierbarkeit.

Damit sind, unter Verwendung der jeweiligen Mutanten, die Voraussetzungen zur Isolierung und Charakterisierung aller an der M13 Replikation beteiligter Proteine gegeben. Dies bedeutet vor allem, daß nun ein "assay" vorhanden ist, mit dem das bislang vergebliche Bemühen um die Isolierung und Charakterisierung des M13 Gen 2-Proteins endlich von Erfolg gekrönt sein wird.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A_{260}/A_{600}	Absorption bei der Wellenlänge 260 bzw. 600 nm
aCTP	Cytosinarabinosidtriphosphat
5'-BrdUTP	5'Bromodesoxyuridintriphosphat
COU	Coumermycin
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
dpm	tatsächliche radioaktive Zerfälle pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase	Desoxyribonuklease
dNTP	allg. für Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	DL-Dithiothreitol
Eco HD-Protein	E.coli Helix-Destabilisierungs-Protein
EDTA	Äthylenglykol-bis(2-aminoäthyläther)N,N'-tetraessigsäure
EtBr	2,7-Diaminoäthyl-9-Phenylphenanthridium-bromid
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure
hh/hl/lh	doppelsträngige DNA, in beiden Strängen mit BrdUTP dichtemarkiert / im Viralstrang / im Komplementärstrang dichtemarkiert
mCi	Millicurie
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMS	Methansulfonsäuremethylester
m.o.i.	multiplicity of infection: das Verhältnis infektiöser Phagenpartikel zur Zahl der Wirtszellen
MOPS	N-Morpholino-3-propansulfonsäure
NAD	Nikotinamidadenosindinukleotid
NAL	Nalidixinsäure
NEM	N-äthylmaleimid
NMN	Nikotinamidmononukleotid
NOV	Novobiocin
OXO	Oxolinsäure
PCMB	p-Chloromercuribenzoesäure
PCS	plasmolysed cell system
PEG	Polyäthylenglykol
pfu	plaque forming unit: biol. Phagentiter

pmol	Picomol
POPOP	1,4-bis-2-(Methyl-5-Phenoxazolyl)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RF	replikative Form DNA
RFI	doppelsträngige, zirkuläre DNA, beide Stränge kovalent geschlossen
RFII	doppelsträngige, offen zirkuläre DNA mit einer Einzelstrangunterbrechung
RIF	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAase	Ribonuklease
rNTP	allg. für Ribonukleosidtriphosphate
S	Sedimentationswert in Svedberg-Einheiten
SS	hier: zirkulär geschlossene bzw. lineare Einzelstrang-DNA von M13
SDS	Natriumdodecylsulfat
STL	Streptolydigin
TCS	toluenized cell system
Tris	Trishydroxyaminomethan
TCA	Trichloressigsäure
µl	Mikroliter, 10^{-6} Liter
upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

1.1. Allgemeiner Teil

Im Dezemberheft 1976 erschien in der Zeitschrift "Bacteriological Reviews" ein Beitrag von Donna Duckworth unter dem Titel "Who Discovered Bacteriophage?" (Duckworth, 1976). Dieser interessante Artikel zeigt auf amüsante Weise, welch große Bedeutung noch heute der Entdeckung von Twort (1915) und/oder d'Herelle (1917) - den Bakteriophagen - beigemessen wird.

Die Biologie, ursprünglich eine rein deskriptive und vergleichende Wissenschaft (Cuvier, Lamarck), durchlief in den letzten Jahrzehnten eine derart rasche Entwicklung, die sicherlich ohne diese Entdeckung nicht vorstellbar gewesen wäre. Ihr verdanken wir die heutigen Detailkenntnisse auf dem Gebiet der Molekularbiologie, vor allem die enormen Fortschritte in der molekularen Genetik. Gerade die Genetik, die sich anfangs höherer Organismen, erst ab der 30er Jahre der Mikroorganismen und noch später der Bakteriophagen als Versuchsobjekte bediente, demonstriert deren große Bedeutung ganz deutlich. Der Anfang der neuen und bis heute andauernden Ära "molekularbiologischen Denkens" ist eng verknüpft mit den Namen M.Schlesinger, F.M.Burnet und W.M.Stanley. Schlesinger zeigte, daß Bakteriophagen mit chemischen und physikochemischen Methoden untersucht werden können, Burnet erkannte ihre Verwendbarkeit für genetische Untersuchungen und Stanley gelang als erstem die Kristallisierung eines Virus, des Tabakmosaikvirus.

Retrospektiv betrachtet verdienen in diesem Zusammenhang jedoch vor allem drei Männer Erwähnung: Hershey, Luria und Delbrück. Sie führten die ersten, richtungsweisenden Experimente mit Bakteriophagen durch: so beispielsweise Hershey, zusammen mit Chase, das nach ihnen benannte, berühmt gewordene $^{35}S/^{32}P$-Doppelmarkierungsexperiment. Sie waren somit übrigens mit die ersten, die radioaktive Isotope für eine biochemische Analyse einsetzten.

Seit dieser Zeit ist man bestrebt, neben vielen anderen Gesetzmäßigkeiten auch die der Vererbung und Entwicklung, als den fundamentalen Voraussetzungen zur Erhaltung alles Lebens, auf molekularer Basis zu untersuchen. Dabei gilt seit Ende der 50er Jahre den zentralen Schritten, nämlich der Replikation, der Transkription und der Translation sowie den entsprechenden Regulationsmechanismen das größte Augenmerk. Während die bei der Transkription und der Translation ablaufenden Prozesse heute nahezu voll-

ständig aufgeklärt sind, bestehen bezüglich der Replikation noch viele offene Fragen. Zu deren Beantwortung einen Beitrag zu leisten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.2. Spezieller Teil

1.2.1. Die Bakteriophagen

Die Bakteriophagen (bakterienspezifische Viren) bilden eine morphologisch äußerst heterogene Gruppe von "Organismen", bestehend aus einer Nukleinsäure und einer sie umgebenden, mehr oder weniger komplex aufgebauten Proteinhülle. Ihre Zugehörigkeit zur belebten Natur wurde beim Anlegen strenger Kriterien lange Zeit angezweifelt. Wesentliche Merkmale hierfür erfüllen die Bakteriophagen nämlich nicht: Sie sind nicht in der Lage zu wachsen oder sich durch Teilung zu vermehren, ferner fehlt ihnen jegliche Motorik. Darüberhinaus besitzen sie als Genom entweder nur einzelsträngige bzw. doppelsträngige DNA oder einzelsträngige RNA, während alle anderen Organismen DNA und RNA gleichzeitig enthalten. Vor allem aber besitzen sie keinen eigenen Stoffwechsel, sondern benötigen für ihre Vermehrung den Stoffwechselapparat lebender (Wirts-)Zellen: sie sind also keine selbstständigen Organismen.
Bakteriophagen sind aufgrund ihrer geringen Abmessungen - ihre Größe schwankt zwischen 25 x 45 nm (ØX 174) und 25 x 200nm (T2) - weder im Lichtmikroskop sichtbar (ultramikroskopisch), noch können sie durch ein Bakterienfilter zurückgehalten werden (ultrafiltrierbar). Trotzdem und gerade deshalb sind sie für die Molekularbiologie unersetzlich: Sie können so auf kleinstem Raum in ungeheuerer Zahl (bis zu 10^{12} pfu/ml) vermehrt werden. Dazu kommt noch als ganz entscheidender Vorteil die kurze Generationszeit der Phagen. Sie beträgt beispielsweise bei vielen E.coli Phagen, abhängig von den physiologischen Bedingungen des Milieus, nur 15 bis 20 Minuten.
Der produktive Infektionsprozess läuft bei allen Phagen im wesentlichen gleich ab. Zunächst erfolgt die Adsorption des Bakteriophagen an den spezifischen Rezeptoren seiner Wirtszelle. Nach der Injektion des Phagengenoms in diese Wirtszelle wird deren Stoffwechsel weitgehend oder sogar vollständig abgeschaltet und auf die Synthese phagenspezifischer Genprodukte umgestellt. Nach der Phagenmorphopoese erfolgt die Freisetzung

intakter Partikel entweder durch Lyse der Wirtszellen oder einen Ausschleusungsprozess durch Poren in der Bakterienzellwand, ohne daß dabei die Wirtszellen abgetötet werden (Ray et al., 1966; Stegen et al., 1970; Watanabe et al., 1967). Pro Zelle können dabei einige hundert Phagen in das umgebende Milieu entlassen werden.
Der Nachweis einer produktiven Phageninfektion bzw. die Titerbestimmung einer Phagensuspension erfolgen einfach dadurch, daß man einen Tropfen einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur mit einer bestimmten Verdünnung der zu untersuchenden Suspension vermischt und auf einer Agarplatte verteilt. Auf dem sich innerhalb weniger Stunden bildenden Bakterienrasen sind dann Löcher, sog. Plaques zu beobachten, die entweder durch die Lyse (klare Plaques) oder durch eine starke Wachstumshemmung der infizierten Zellen (trübe Plaques) entstanden sind. Die Anzahl dieser Plaques multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ergibt dann den Phagentiter der jeweiligen Suspension.

1.2.2. Die einzelsträngigen DNA-Phagen ØX174 und M13

Der Bakteriophage M13 gehört zu der Gruppe der filamentösen Phagen (Ff). Er ist circa 870 nm lang und besitzt einen Durchmesser von nur 6 nm (Marvin et al., 1960). Die Proteinhülle, aufgebaut aus circa 3000 Molekülen des M13 Gen 8-Proteins und 1-3 Molekülen des M13 Gen 3-Proteins (Pratt et al., 1969), umschließt das Genom des Phagen: ein einzelsträngiges, zirkulär geschlossenes DNA-Molekül mit einem Molekulargewicht von 1.9×10^6 dalton. Es ist aus 5740 ± 210 Nukleotiden aufgebaut und kodiert somit für 1913 ± 70 Aminosäuren (Berkowitz et al., 1974).
Bislang wurden einige hundert konditional lethale Mutanten von M13 gefunden und genetisch charakterisiert. Sie konnten insgesamt acht Komplementationsgruppen zugeordnet werden. Die physiologische Rolle der einzelnen Genprodukte ist noch nicht in allen Fällen eindeutig geklärt (Pratt et al., 1966; Pratt et al., 1969).
Bei der Replikation der Phagen-DNA sind die Gen 2- und Gen 5-Proteine beteiligt, von Kornberg wird auch die Beteiligung des Gen 3-Proteins postuliert (Jazwinski et al., 1973). Für die Gen 1-, 4-, 6- und 7-Proteine konnte bislang nur eine, noch nicht genau definierte Beteiligung an der Phagenmorphopoese nachgewiesen werden.

Als Wirtszellen von M13 dienen E.coli F^+ Stämme, an deren F-Pili der Phage

adsorbiert (Marvin et al., 1969; Jacobsen et al., 1972; Marco et al., 1974). Er kann aber genau so effizient in Sphäroblasten aus E.coli F^- Stämmen zur Vermehrung gebracht werden, d.h., bezüglich der M13 Infektion spielt der F-Faktor von F^+ Stämmen nur insofern eine Rolle, als er u.a. jene, die phagenspezifische Adsorptionsstelle kodierende, Nukleotidsequenz umfaßt. Wenngleich für diese Theorie der Phagenadsorption eine Reihe von Publikationen angeführt werden können, so dürfen doch die Widersprüche dazu, welche durch die Arbeit von Marco geliefert wurden, nicht außer Acht gelassen werden. Unter den Bedingungen, unter denen die früheren Arbeiten durchgeführt wurden, scheinen weder Adsorption an die Zelloberfläche, noch Penetration viraler DNA und Bildung parenteraler RF Moleküle möglich zu sein. Die letzteren sind aber nach neueren Arbeiten miteinander gekoppelt. Unter den Versuchsbedingungen, die Marco gewählt hatte, waren diese gekoppelten Schritte möglich und dabei schien die Adsorption der Phagen DNA eher an der Zelloberfläche als an den Pili stattzufinden. Seine Theorie ist nun, wofür auch die Infizierbarkeit von Sphäroblasten aus F^- Zellen spricht, daß die üblicherweise verwendeten Rezeptoren auf der Zelloberfläche der F^- Stämme maskiert sind und deshalb keine Infektion durch M13 erfolgen kann.

Nicht unerwähnt bleiben soll in diesem Zusammenhang ØX174, da während der Durchführung der Experimente für die vorliegende Arbeit von zwei amerikanischen Forscherteams (Kornberg und Hurwitz) entsprechende Versuche mit diesem E.coli-Bakteriophagen durchgeführt wurden.
ØX174 gehört, im Gegensatz zu M13 zur Gruppe der ikosaedrischen Phagen. Sein Durchmesser mißt 250 Å, seine Hülle ist aus 60 Molekülen seines Gen F Proteins aufgebaut. Wie M13 besitzt auch ØX174 als Genom ein zirkulär geschlossenes, einzelsträngiges DNA-Molekül, das aus ca. 5400 Nukleotiden aufgebaut ist und für 8 bis 9 Proteine codiert. Der Infektionsprozeß läuft virulent ab:
Die Proteinbiosynthese des Wirts wird vollständig abgeschaltet und nach dem Heranreifen der neuen Phagengeneration wird diese durch Lyse des Wirts in das umgebende Milieu freigesetzt.

Die Größe des Genoms und der Replikationzyklus (drei zeitlich aufeinander folgende Schritte) weisen einerseits Paralellen zu M13 auf, andererseits scheinen die beiden Phagen völlig verschiedene "Enzymgarnituren" der Wirtszelle für ihre Replikation zu benützen, so ist beispielsweise der erste Schritt im Replikationszyklus des Phagen ØX174 im Gegensatz zu dem

von M13 (siehe im folgenden Abschnitt) Rifampicin-resistent, d.h. den initialen Schritt der DNA-Replikation (die Synthese des RNA-Primers) vollzieht eine Rifampicin-resistente RNA-Polymerase. Als weiterer Unterschied sei in diesem Zusammenhang nur erwähnt, daß für eben diesen ersten Replikationsschritt ØX mindestens 8 Wirtsproteine, also deutlich mehr als M13 (5 Proteine) benötigt.

1.2.3. Der DNA Replikationszyklus von M13

Der Replikationszyklus von M13 kann in drei, zeitlich aufeinander folgende Schritte unterteilt werden:
Als erster Schritt erfolgt die Umwandlung der infizierenden, viralen Einzelstrang-DNA in ein doppelsträngiges RFI Molekül (parentaler RF). Das heißt, zu dem als Matritze fungierenden Viralstrang wird ein Komplementärstrang synthetisiert (SS - RF)). Anschließend wird dieses RFI Molekül mehrfach semikonservativ repliziert und dadurch ein sog. "pool" von circa 200 - 300 Tochter-RF Molekülen gebildet (RF - RF) (Ray et al., 1966a; Hohn et al., 1971). An diesen wiederum erfolgt unter Verdrängung der vorhandenen und gleichzeitiger Synthese neuer Viralstränge die Bildung einzelsträngiger Nachkommen-DNA (RF - SS). Für diese drei Schritte im Replikationszyklus werden im Grund genommen nur zwei verschiedene Reaktionen benötigt: einerseits die Synthese von Viralsträngen und andererseits die Umwandlung einzelsträngiger DNA in die doppelsträngige Form durch die Synthese von Komplementärsträngen.
An der Bildung parentaler RFI Moleküle sind ausschließlich Wirtsenzyme beteiligt und, wie die Resistenz dieses Schritts gegenüber Chloramphenicol beweist, ausnahmslos Proteine, welche bereits in der Zelle vorliegen (Brutlag et al., 1971; Fidanian et al., 1972; Pratt et al., 1968). Interessanterweise wird die SS - RF Umwandlung durch Rifampicin, einem spezifischen Hemmer der RNA-Polymerase, vollständig blockiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Synthese des Komplementärstrangs über einen sogenannten RNA-"primer" initiiert wird, welcher das von den DNA-Polymerasen für den Kettenstart benötigte freie 3'Hydroxylende liefert (Wickner et al., 1972). Neben der E.coli RNA-Polymerase ist eine Reihe weiterer Wirtsenzyme an der Bildung des Komplementärstrangs und somit eines doppelsträngigen Moleküls beteiligt:
Einmal das E.coli HD-Protein, dessen Aufgabe darin besteht, einerseits das Auffinden der richtigen Initiationsstelle ("origin") für die RNA-Polymerase zu erleichtern und andererseits durch Abdecken der restlichen DNA die Transkription dieser Nukleotidsequenz zu verhindern (Geider, K. et al., 1974).

Die eigentliche Synthese des Komplementärstrangs erfolgt durch das DNA-Polymerase III Holoenzym. Dieses Enzym ist ein Oligomer aus mindestens vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 32000 und 140000 daltons:

Die Alfa-Untereinheit (der Polymerase III = dna E Genprodukt), ist für sich allein, ebenso wie die anderen Untereinheiten Beta (copol III^+ bzw. Faktor I), Gamma (bzw. Faktor II) und Delta (bzw. Faktor III = dna Z Genprodukt) inaktiv . Erst der, mit der copol III^+ rekonstituierte Komplex aus den Untereinheiten Alfa, Gamma und Delta (zusammen als pol III^+ bezeichnet) ergibt die volle Enzymaktivität (McHenry, C. et al., 1977).
Für den abschließenden Ringschluß des Komplementärstrangs ist Voraussetzung, daß zuvor der RNA-primer abgebaut wurde. Dies besorgt ein weiteres Enzym, die DNA-Polymerase I, das sogenannte Kornberg-Enzym. Sie besitzt nämlich neben ihrer Polymerase-Aktivität zwei weitere enzymatische Aktivitäten: die einer von 5' nach 3' und einer von 3' nach 5' gerichteten Exonuklease. Mit der 5' nach 3' Exonukleaseaktivität wird der RNA-primer abgebaut und die entstehende Lücke gleichzeitig mit der Polymeraseaktivität wieder aufgefüllt (Geider, K. et al., 1974; Westergaard, O. et al., 1973).
Den eigentlichen Ringschluß vollzieht die DNA-Ligase, welche die letzte Phosphodiesterbindung knüpft.

Die parentalen RFI Moleküle, also diejenigen, welche den infizierenden Viralstrang enthalten, werden im nächsten Schritt des M13 Replikationszyklus mehrfach repliziert. Daß hierbei nur ein phagenspezifisches Protein, nämlich das Gen 2-Protein, beteiligt ist, konnte durch zwei verschiedene Experimente (Pratt, D. et al., 1968) gezeigt werden:
Einerseits durch die Infektion von M13 Mutanten, welche eine Ambermutation in Gen 2 enthielten (Fidanian, H.M. et al., 1972) und andererseits durch die Zugabe von Chloramphenicol, einem spezifischen Hemmer der Proteinbiosynthese, in das Kulturmedium. In beiden Fällen wurden zwar die parentalen RF Moleküle gebildet, deren anschließende Replikation unterblieb jedoch. Damit war die essentielle Bedeutung eines funktionellen Gen 2-Produkts bewiesen.

Da das Fehlen des Gen 2-Proteins das zahlenmäßige Verhältnis von RFII zu RFI Molekülen reduziert, wurde vermutet, daß dieses Protein entweder als spezifische Endonuklease bzw. als aktivierendes Agens eines solchen Wirtsenzyms fungiert und/oder durch eine Modifikation des 5'Terminus für die Stabilisierung von RFII Molekülen sorgt. Folglich wird durch das Fehlen stabiler RFII Replikationsintermediate der Block nach dem ersten Schritt im Replikationszyklus von M13 ausreichend erklärt.

Aufgrund zahlreicher in vivo Daten wurde bislang die Beteiligung von sechs bakteriellen Genprodukten an der RF-Replikation nachgewiesen. Neben den bereits genannten Enzymen DNA-Polymerase I, DNA-Polymerase III Holoenzym und RNA-Polymerase, sind dies das rep-Protein, das dna B und dna G Protein (Brutlag, D. et al., 1971; Fidanian, H.M. et al., 1972; Olson, W.L. et al., 1972; Fidanian, H.M. et al., 1974; Staudenbauer, W.L. et al., 1973; Staudenbauer, W.L., 1974).
Die Rollen der dna B und dna G Genprodukte sind noch ungeklärt. Feststeht bisher nur, daß es sich bei dem dna G Protein um eine Rifampicin-resistente RNA-Polymerase handelt, welche zur Synthese eines Oligonukleotid-primers auf der einzelsträngigen DNA des Bakteriophagen G4 befähigt ist (Bouché, J.P. et al., 1975; Ray, D.S. et al., 1975). Der Schluß liegt nahe, daß das Protein eine ähnliche Funktion bei der M13 RF-Replikation erfüllt.
Temperatur-shift Experimente mit dna B bzw. dna G ts-Mutanten lassen vermuten, daß beide Genprodukte für frühe Schritte während der RF-Replikation benötigt werden. Wurden die Bedingungen nämlich so gewählt, daß die Zellen kurze Zeit bei permissiver Temperatur replizieren konnten, ehe sie auf restriktive Temperatur eingestellt wurden, dann konnten in beiden Fällen sowohl die anschließende Einzelstrangsynthese als auch die Phagenreifung mit normaler Rate ablaufen (Primrose, S.B. et al., 1968).
Wie bereits angedeutet, wird bei der RF-Replikation ein sog. pool von RF-Molekülen gebildet, der zweierlei Aufgaben erfüllt: Zum einen erfolgt an diesen Molekülen die M13 Transkription, zum anderen schafft dieser RF-pool die Voraussetzung zur Synthese einzelsträngiger Nachkommen-DNA im dritten Schritt des Replikationszyklus von M13.
Daß die Transkription an diesem RF-pool erfolgt, wurde u.a. dadurch gezeigt, daß die Infektion nicht permissiver Wirte mit M13 am2 Mutanten sowohl einen Block nach Schritt 1 des Replikationszyklus bewirkt, als auch die Synthese des Gen 5-Proteins partiell gehemmt wird. Dagegen steigt in dem Maß, in dem RF-Moleküle bei einer WT-Infektion synthetisiert werden, auch die Syntheserate des Gen 5-Proteins an (Smilowitz, H. et al., 1971; Mazur, B.J. et al. 1973).
Für den dritten Schritt, der Einzelstrangsynthese, wird neben dem Gen 2-Protein, das wahrscheinlich auch hier die zur Initiation der Replikation notwendige strangspezifische Diskontinuität einführt, das Gen 5-Protein benötigt (Marvin, D. et al., 1969; Pratt, D. et al., 1968). Das Umschalten von RF-Replikation auf SS-Synthese wird ausschließlich durch die vorhandene Menge dieses Proteins bestimmt (Mazur, B.J. et al., 1973; Mazur, B.J. et al., 1975). Es fungiert dabei als Inhibitor der Komplementärstrangsynthese, indem

es an den wachsenden Viralstrang bindet und ihn dadurch möglicherweise gleichzeitig stabilisiert. Die hohe intrazelluläre Konzentration des Proteins (ca. 10^5 Moleküle pro Zelle) legt die Vermutung nahe, daß es keine enzymatische, sondern eine rein strukturelle Funktion - ähnlich dem Gen 32-Protein des Phagen T4 - besitzt, wofür auch die Isolierung entsprechender Gen 5/DNA-Komplexe spricht. In diesen Komplexen sind circa 1600 Gen 5 Proteinmoleküle an einen Viralstrang gebunden (Oey, J.L. et al., 1972; Alberts, B. et al., 1972; Huberman, J.A. et al., 1971).

An der SS-Synthese ist eine Reihe von Wirtsenzymen beteiligt:
das dna C, das dna E und das polA Genprodukt (Staudenbauer, W.L., 1974; Mitra, S. et al., 1973; Chen, J. et al., 1976; Primrose, S.B. et al., 1968) sowie die DNA-Ligase. Es muß jedoch einschränkend bemerkt werden, daß die Rolle des dna C Genprodukts völlig unklar ist. Anders als bei der RF-Replikation werden weder das dna B, noch das dna G Genprodukt benötigt. Unbekannt ist bislang, inwiefern die RNA-Polymerase involviert ist. Die Rifampicin-Sensitivität dieses Schritts, normalerweise ein sicherer Beweis für die Beteiligung dieses Enzyms an einer Reaktion, kann hier möglicherweise auch ein Sekundäreffekt sein, der aus der Hemmung der Transkription des Gen 2 und Gen 5-Proteins resultiert. Außerdem zeigte sich, daß die Viralstrangsynthese etwa 10-fach weniger Rifampicin-sensitiv ist, als die Komplementärstrangsynthese:
auch dieser Sachverhalt spricht nicht eben für eine Beteiligung der RNA-Polymerase an der Viralstrangsynthese (Staudenbauer, W.L. et al., 1972; Fidanian, H.M. et al., 1974)..

Auf den Mechanismus der M13 Replikation sei im Rahmen dieser Arbeit nur kurz eingegangen:
Seit jeher galt das besondere Augenmerk einerseits dem Mechanismus der RF-Replikation - als einem idealen Modell für Untersuchungen eines derartig komplexen molekularbiologischen Vorgangs - und andererseits der Viralstrangsynthese. Aufgrund zahlreicher physikalischer, chemischer und elektronenmikroskopischer Befunde wurde eine Reihe von Mechanismen diskutiert. Einen allgemeinen Beifall fanden schließlich nur zwei der Modelle: die von Cairns im Jahr 1963 (Cairns, J., 1963) und von Gilbert und Dressler im Jahre 1968 (Gilbert et al., 1968) vorgeschlagenen Modelle.
Nach dem von Cairns vorgeschlagenen Modell geht die Replikation eines ringförmigen, doppelsträngigen DNA-Moleküls von einer definierten Startstelle aus, an der die DNA partiell entwunden ist. Unter gleichzeitiger Synthese

des (+) und des (-) Strangs bewegt sich die sog. Replikationsgabel um das gesamte Molekül herum, bis hin zum Replikationsterminus. Durch einen endonukleolytischen Schnitt werden die beiden Tochtermoleküle (aus je einem alten und einem neusynthetisierten Strang bestehend) getrennt.
Nach dem von Gilbert und Dressler vorgeschlagenen, sog. rolling-circle-Modell, erfolgt am Startpunkt der Synthese eine Verdrängung des alten (+) Strangs, welcher ein endonukleolytisch entstandenes, freies 5'OH-Ende trägt, durch die gleichzeitige Synthese eines neuen (+) Strangs. An diesem freien (+) Strang wird nach Abschluß einer Replikationsrunde ein entsprechender (-) Strang synthetisiert. Beim Erreichen einer bestimmten DNA-Sequenz (der Sequenz, in die beim Start der endonukleolytische Schnitt gesetzt wurde) wird das Molekül geschnitten und anschließend zirkularisiert.
Nach neueren Erkenntnissen, die aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen und mit Hilfe zahlreicher Zentrifugationstechniken gewonnen wurden, ergibt sich für die M13 Replikation das folgende Bild:

Der in drei, zeitlich aufeinander folgende Schritte trennbare Replikationszyklus von M13 läuft nach nur zwei unterschiedlichen Mechanismen ab. Zum einen erfolgt die Umwandlung viraler Einzelstrang-DNA in die doppelsträngige Form (Synthese parentaler RF-Moleküle) durch die Synthese eines Komplementärstrangs und zum anderen dienen diese RF-Moleküle als Matritze zur Synthese neuer Viralstränge: In Abhängigkeit von der Gen 5-Protein Konzentration werden an diesen Viralsträngen dann entweder Komplementärstränge, (-)Stränge, synthetisiert oder sie werden durch Bindung von Gen 5-Protein als Nachkommen-Einzelstrang-DNA in neue Phagen verpackt. Ein spezieller Mechanismus für die RF-Replikation kann daraus nicht mehr abgeleitet werden (Kessler-Liebscher, B. et al., 1977).

1.2.4. Spezielle Fragestellung

Der Replikationszyklus von M13 läßt sich in drei zeitlich aufeinander folgende Schritte gliedern: die Einzelstrang in Doppelstrang-Umwandlung, die RF-Replikation und die Einzelstrangsynthese. Während der erste Schritt ausschließlich von Wirtsenzymen vollzogen wird, werden für die späteren Schritte im Replikationszyklus zwei phagenspezifische Proteine, nämlich das Gen 2-Protein und das Gen 5-Protein benötigt.
Bisher war es nur möglich, den ersten Schritt des Replikationszyklus, also die Bildung parentaler RF-Moleküle, in vitro nachzuvollziehen. Dies gelang sowohl in Rohextrakten aus uninfizierten E.coli Zellen, als auch im

rekonstituierten System mit hochgereinigten Enzymen bzw. anderen Proteinen.
Seit langem bestand aber das größere Interesse darin, doppelsträngige M13 DNA in vitro zu replizieren. Die Gründe hierfür sind darin zu suchen, daß es solche Experimente erlaubt hätten, auf relativ einfachem Weg mit dem enzymatischen Replikationsablauf des Wirts gut korrelierbare Daten zu erhalten. Die entsprechenden Versuche waren jedoch, wahrscheinlich wegen einer zu geringen Konzentration der beteiligten Proteine, alle gescheitert: Bisher gelang die in vitro Replikation doppelsträngiger DNA nur mit RF-Molekülen des einzelsträngigen DNA-Phagen ØX174 (Sumide-Yasumoto, C. et al., 1976; Eisenberg, S. et al., 1976). Beide Autoren bedienten sich eines Gemisches von Extrakten aus uninfizierten und infizierten E. coli Zellen.
Zum anderen gelang eine Doppelstrang-Replikation im T4 und T7-System, wobei jedoch einschränkend bemerkt werden muß, daß die Bakteriophagen T4 und T7 selbst den Hauptteil der zur Replikation notwendigen Proteine beisteuern (Imae, Y. et al., 1976; Imae, Y. et al., 1976a; Masker, W.E. et al., 1976a).

Die Priorität dieser Arbeit war es folglich, ein in vitro System zu entwickeln, in dem die Replikation doppelsträngiger M13 RF DNA ablaufen konnte. Hierfür war eine wesentliche Voraussetzung , die Ausverdünnung entscheidender Komponenten - ein im übrigen allen in vitro Systemen anhaftender Mangel - weitestgehend auszuschließen.

Zu diesen wesentlichen Komponenten gehört die Gruppe der sogenannten HD-Proteine ("helix destabilising proteins"), wie beispielsweise das E.coli HD-Protein oder das M13 Gen 5-Protein. Es war deshalb das zweite Ziel der Arbeit, den Effekt der beiden Proteine auf die DNA-Replikation zu untersuchen. Dabei sollte speziell auf die Frage, ob ein Gen 5-Protein abhängiges Umschalten von RF-Replikation auf Einzelstrangsynthese in vitro ermöglicht würde, eine Antwort gefunden werden.
Parallel sollte in einem weiteren Teil der Arbeit geklärt werden, inwiefern die Verwendung eines sogenannten spezifischen Hemmers der DNA-Replikation, hier Novobiocin, eine klare Antwort darauf gibt, ob es sich bei der in vitro durchgeführten DNA-Synthese um eine echte Replikation handelt oder nicht. Anders ausgedrückt, ob in Zusammenhang mit einer Novobiocin-Hemmung das Wort "spezifisch" zu Recht Verwendung findet.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Bakterienstämme und Bakteriophagen

Stamm	besondere genetische Eigenschaften
E.coli H560	F^+ $polA_1$ str^r thy endI tsx $\emptyset X^s$ (1)
E.coli K12 AB301	F^+ met $RNAase^-$ (2)
E.coli K37	Hfr met^+ rel-1 tonA22 T_2^r PO2A $phoA_4$ supD32 sul^+ (3)
E.coli K38	Hfr met^+ rel-1 tonA22 T_2^r PO2A $phoA_4$ (4)
E.coli TG169	F^- $polA_1$ dnaB thy his thi malA str (5)
E.coli 159	F^+ thy uvr str^r su (6)
M13	WT (7)
M13 am5	am5 (8)

(1): De Luria, P. et al., 1969; (2): Gesteland, R.F., 1966; (3): Zinder, N.D. et al., 1964; (4): Zinder, N.D. et al., 1964; (5): Mordoh, J. et al., 1970 Masker, W. E. et al., 1973; (6): Pratt, D. et al., 1968; (7): Hofschneider, P.H., 1963; (8): Pratt, D. et al., 1966.

2.1.2. Nährmedien, Nährböden und Puffer

2.1.2.1. Hershey-Broth: pro Liter Medium sind enthalten:
10 g Difco Nutrient Broth
5 g Difco Bacto Pepton
1 g Glucose
5 g NaCl
pH = 7.5 mit NaOH eingestellt;

2.1.2.2. Hanawalt(H-)-Medium setzte sich, wie von Maaloe beschrieben (Maaloe, O. et al., 1961), zusammen;

2.1.2.3. M9-Medium: es wurde das von Miller (Miller, J., 1972) beschriebene Medium verwendet, in das für die TG169-Zucht noch zusätzlich 20 mg/ml Histidin gegeben wurden;

2.1.2.4. M3-Medium: pro Liter Medium wurden 17.5 g Difco M3-Medium eingewogen;

2.1.2.5. EDTA-Borat-Puffer ist EDTA (5 mM), Natriumtetraborat (50 mM), pH = 9.0;

2.1.2.6. Phosphatpuffer ist KH_2PO_4/K_2HPO_4 (50 mM), pH = 7.5;

2.1.2.7. TEN-Puffer ist Tris.HCL (50 mM), pH = 8.0 EDTA (5 mM), NaCl (0.1 M);

2.1.2.8. MOPS-Puffer ist N-Morpholino-3-propansulfonsäure (20 mM), pH = 8.0, eingestellt mit KOH;

2.1.2.9. HEPES-Puffer ist N-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure (20 mM), pH = 8.0;

2.1.2.10. Stop-Puffer ist NaOH (0.5 M), SDS (0.5%), bei 20°C gesättigte PP_i-Lösung (10 %);

2.1.2.11. Puffer A ist Tris·HCl (50 mM), pH = 7.8, Rohrzucker (20 %, w/v), EGTA (10 mM);

2.1.2.12. Puffer B ist Tris·HCl (20 mM), pH = 7.8, $MgCl_2$ (5 mM), EDTA (0.1 mM);

2.1.2.13. Tris-EDTA-Brij ist Tris·HCl (20 mM), pH = 8.0, EDTA (40 mM), Brij 58 (0.5%);

2.1.2.14. Bodenagar enthält in einem Liter:

2.5 g NaCl
2.5 g KCl
10.0 g Bacto-Typton
20.0 g Bacto-Agar

2.1.2.15. Topagar enthält in einem Liter:

5.0 g NaCl
10.0 g Bacto-Trypton
7.0 g Bacto-Agar
0.1 g $CaCl_2$ (1 M)
0.1 g Thymidin (10 mg/ml)

2.1.2.16. Trägeragar für das Cellophanfoliensystem enthält pro Liter:

20.0 g Bacto-Agar
4.8 g Hepes-KOH (pH = 7.5)
1.1 g MgAc

2.1.3. Chemikalien

aCTP	2	Nalidixinsäure	5,3
5'-BrdUTP	1	NEM	6
Brij 58	3	NMN	1
Chloramphenicol	1	Novobiocin	2
Coumermycin	11	Oxolinsäure	10
dNTP	1	PCMB	6
DTT	2	PEG 6000/20000	3
EDTA	8	polyUG	1
EGTA	3	radioakt. mark. Substrate	7
Äthidiumbromid	6,2	rNTP	1
HEPES	2	Rifampicin	4
2-Mercaptoäthanol	3	Sarkosyl NL97	9
Mitomycin C	1	SDS	3
MMS	8	Spermidin	3
MOPS	3	Streptomycinsulfat	1
NAD	1	Thiamin·HCl	3

1 Boehringer, Mannheim
2 Sigma, USA
3 Serva, Heidelberg
4 Grünenthal, Stolberg
5 Winthrop, Frankfurt/M.
6 Calbiochem, USA
7 Radiochemical Centre, England
8 Merck, Darmstadt
9 Ciba-Geigy, Basel
10 Gödecke, Freiburg
11 Bristol Laboratories, USA

Alle übrigen Chemikalien stammten von Merck, Darmstadt.

2.1.4. Enzyme und andere Proteine

Ribonuklease T_1, Endonuklease aus N.crassa und Proteinase K stammten von Boehringer, Mannheim; Lysozym und Ribonuklease K (aus Rinderpankreas) stammten von Sigma, USA; DNAase stammte von Serva, Heidelberg; die Restriktionsendonuklease Hin dII wurde mir von Dr.J. Messing zur Verfügung gestellt.

E.coli RNA-Polymerase war ein Geschenk von Herrn Prof.Dr.W.Zillig. E.coli HD-Protein und M13 Gen 5-Protein wurden nach den von Alberts (Alberts et al., 1972) und Sigal (Sigal et al., 1972) beschriebenen Methoden von Dr. B. van Dorp gereinigt und mir freundlicherweise überlassen.

2.1.5. Filter und Folien

Nitrocellulosefilter mit einer Porengröße von 0.6 µm stammten von den Firmen Sartorius, Göttingen und Schleicher & Schüll, Dassel;
Papierfilter stammten von der Firma Whatman;
als Cellophanfolie wurde Alba-Einmachhaut von Gehring & Neiweiser, Bielefeld verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Phagenzucht

M13 WT und M13 am5 wurden grundsätzlich auf Agarplatten gezogen, um die Stämme so sauber wie möglich zu halten: M13 am5 Revertanten konnten damit weitgehend unterdrückt werden. Als Wirte dienten E.coli AB 301 (für M13 WT) und E.coli K37 bzw. K38 (für M13 am5).

Zur Zucht wurden Petrischalen zunächst mit 10 ml Bodenagar gefüllt. In einem 45°C warmen Wasserbad wurden dann in Verdünnungsröhrchen 3 ml flüssiger Topagar mit 0.2 ml der entsprechenden E.coli Obernachtkultur und 0.1 ml einer Phagenverdünnung vermischt und auf den Bodenagar gegossen. Die jeweils verwendeten Phagenverdünnungen hatten einen Titer, welcher die Infektion aller Wirtszellen gewährleistete. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C.

Danach wurde die Topagarschicht abgekratzt, in EDTA-Borat-Puffer aufgeschwemmt, 2 Stunden in der Kälte gerührt und dann abzentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 10000 upm, 15 Minuten bei 2°C). Die anschließende PEG-Fällung der im Oberstand befindlichen Phagen erfolgte nach der von Yamamoto (Yamamoto, K.R. et al., 1970) beschriebenen Methode. Die Phagen wurden in EDTA-Borat-Puffer resuspendiert und über einen neutralen Rohrzucker-Gradienten von 35 ml (Rohrzucker 10 % - 20 % w/v in EDTA-Borat) gereinigt.

Zur Titerbestimmung wurden M13 WT auf E.coli AB 301, M13 am5 auf E.coli K37 su^+ sowie E.coli K38 su^- ausplattiert; die Reversionsrate der am5 Mutante lag bei 10^{-5} bis 10^{-6}. Die Phagensuspensionen hatten üblicherweise einen Titer von 2×10^{13} pfu/ml.

2.2.2. Isolierung und Reinigung ^{32}P markierter M13 Einzelstrang DNA und RFI DNA

Zur Herstellung der als Sedimentations- bzw. Dichtemarker verwendeten ^{32}P-markierten M13 DNA, wurden 100 ml H-Medium mit 5 ml einer E.coli AB 301 Obernachtkultur beimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer Zelldichte von 2.5×10^8 Zellen/ml belüftet. Dann wurde 1 mCi $^{32}P_o$ in das Medium gegeben und die Zellen mit M13 WT (m.o.i. = 10) infiziert. Nach 2 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und die Phagen im Oberstand mit PEG gefällt. Die Phagen wurden dann über einen Rohrzucker-Gradienten (2.2.4.) gereinigt, nach der im Labor üblichen Methode (Wirtz et al., 1970) mit Phenol extrahiert,

die DNA mit Alkohol bei -20°C gefällt und anschließend über einen Rohrzucker-Gradienten (1.0 M NaCl) (2.2.4.) gereinigt.
Die Aufarbeitung der M13-infizierten Zellen zur Isolierung und weiteren Reinigung von M13 ^{32}P-markiertem RFI erfolgte nach der von Tanaka (Tanaka et al, 1975) beschriebenen Methode.

2.2.3. Isolierung und Reinigung von M13 SS- und RFI-DNA im präparativen Maßstab

Die Isolierung und Reinigung großer Mengen (bis zu 1 mg/ml) unmarkierter M13 SS- und RFI-DNA erfolgte im wesentlichen nach den unter 2.2.2. beschriebenen Methoden. Allerdings wurden hierfür jeweils 4 l Kulturen angesetzt und als Nährmedium Hershey Broth verwendet. Um besonders saubere Präparationen zu bekommen, wurde die DNA durch eine an obige Aufarbeitung anschließende Gleichgewichtszentrifugation in einem neutralen CsCl-EtBr-Gradienten (2.2.4.) weitergereinigt. Die Analyse der gereinigten DNA mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (siehe Abb.1/2, von Agarose-Gelen (2.2.6.) und von Bandsedimentation in alkalischen CsCl-Gradienten (2.2.4.) ergab, daß die SS- bzw. RFI-Präparationen zu über 95% rein waren und intakte Moleküle enthielten.

Abb.1/2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von M13 RFI Molekülen

2.2.4. Zentrifugationstechniken

Bandsedimentation in neutralen Rohrzucker-Gradienten:

In Nitrocelluloseröhrchen wurden 35 ml Gradienten von 5 % - 20 % (w/v) Rohrzucker in TEN-Puffer mit Hilfe eines zweikammerigen Mischgeräts vorgegeben. Die Probe (bis zu 1 ml) wurde überschichtet und in einem Spinco SW 27 Rotor bei 25.000 upm und 4°C für 14 Stunden zentrifugiert.

Bandsedimentation in alkalischen CsCl-Gradienten:

Verwendet wurden 4.2 ml Gradienten der Dichte 1.2 - 1.4 g/cm^3. Die Zentrifugation erfolgte in Spinco SW 56 Rotoren (ebenfalls in Nitrocelluloseröhrchen) bei 40.000 upm und 8°C für 1 bzw. 3 Stunden.

Gleichgewichtszentrifugationen:

Gleichgewichtszentrifugationen erfolgten in Spinco Ti 50 Rotoren. Es wurden Polycarbonatröhrchen verwendet, welche mit den im folgenden jeweils angegebenen Lösungen gefüllt und mit Paraffin überschichtet wurden. Die Zentrifugation erfolgte bei 40.000 upm und 15°C für 40 Stunden. Gleichgewichtszentrifugation in

neutralen CsCl-Gradienten: Lösung aus 5.2 g CsCl und 4 g Probe + TEN;

alkalischen CsCl-Gradienten: Lösung aus 5.2 g CsCl, 0.6 g NaOH (2 M), 0.6 g EDTA (0.5 M), 2.8 g Probe + H_2O;

neutralen CsCl-EtBr-Gradienten: Lösung aus 4.8 g CsCl, 2.5 g EtBr (1 mg/ml), 2.5 g Probe + TEN-Puffer;

neutralen CsCl-polyUG-Gradienten: Lösung aus 6.6 g CsCl und 5 g Probe + TEN; die Probe bestand aus 0.5 ml polyUG (2 mg/ml), 0.025 ml Sarkosyl (5%), 0.7 ml EDTA (5 mM). und 0.8 ml DNA-Lsg.; sie wurde vor der Zentrifugation für 5 min auf 100°C erhitzt und anschl.im Eisbad rasch abgekühlt.

Alle Gradienten wurden nach den Läufen durch Anstechen mit einer Nadel von unten her fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden entweder direkt auf Papierfiltern aufgefangen (2.1.5.), getrocknet, in Röhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gebracht und die Radioaktivität bestimmt oder aber erst TCA-gefällt (2.2.5.).

2.2.5. TCA-Fällung und Messung der Radioaktivität

Zur Messung der säureunlöslichen Radioaktivität wurden die einzelnen Fraktionen (bzw. Aliquots daraus) jedes Gradienten in 5 ml eiskalter TCA (5 %ig) getropft, nach 15 Minuten durch Sartorius-Membranfilter (2.1.5.) filtriert und mit destilliertem Wasser gut nachgewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Filter in Röhrchen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (2.5 l Toluol, 12.5 g PPO, 0.75 g POPOP) gebracht und die Radioaktivität im Szintillationsspektrophotometer (Nuclear Chikago) bestimmt. Die Zählausbeute (cpm) für Tritium lag bei ca. 30 % der tatsächlich auftretenden radioaktiven Zerfälle (dpm). Es entsprachen dabei ca. 500 cpm einem Einbau von 1 pmol dNMP in säureunlösliches Material.

2.2.6. Analytische Agarose-Gele

Zur Untersuchung der Reinheit der DNA-Präparationen und für Produktanalysen wurden 0.8 % bzw. 1.5 % Agarose-Gele verwendet, wie sie von Kessler-Liebscher (Kessler-Liebscher et al., 1976) beschrieben wurden.

2.2.7. Herstellung der in vitro Systeme

Plasmolysiertes Zellsystem (PCS):

Die Herstellung des PCS erfolgte nach der von Kessler-Liebscher et al. 1976) beschriebenen Methode.

Toluol-behandelte Zellen (TCS):

Die Herstellung des TCS erfolgte nach der von Masker (Masker, W.E., 1973) beschriebenen Methode.

Extrakte aus uninfizierten (E_0) bzw. M13 am5 infizierten Zellen (E_i):

41 - Kulturen E.coli 159 wurden in Hershey-Broth gezogen. Bei Erreichen einer $O.D._{600}$ = 0.5 (entspr. 2 x 10^8 Zellen pro ml) wurde die Kultur entweder bei Raumtemperatur abzentrifugiert oder mit M13 am5 (moi = 20) infiziert, 20 Minuten weiterbelüftet und dann ebenfalls bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in Tris-Rohrzucker (50 mM Tris · HCl, pH = 8.0, 10 % (w/v) Rohrzucker) resuspendiert und in einem Aceton/Trockeneis-Bad eingefroren. Zellen konnten so über

mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur Lyse wurden die Bakterien bei ca. 10°C aufgetaut, in Ti 50 Röhrchen gebracht und mit 1/10 Volumen Lysozym (2.5 mg/ml) sowie 0.025 Volumina KCl (4 M) 30 Minuten bei 0°C, anschließend 90 Sekunden bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde 15 Minuten bei 40.000 upm und 2°C zentrifugiert, und der Extrakt in Portionen à 0.1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Da das E.coli Chromosom zusammen mit der Zellmembran abzentrifugiert wurde, enthielten folglich nur die aus M13 am5 infizierten Zellen hergestellten Extrakte endogene DNA (M13 RFI und RFII).

Cellophanfoliensystem:

Petrischalen wurden mit 50 ml Agar (2.1.2.16) gegossen und kühl (2° - 4°C) aufbewahrt. Aus geeigneten Cellophanfolien (2.1.5.) wurden Plättchen mit einem Durchmesser von 12 mm gestanzt, in destilliertem Wasser angefeuchtet, auf die Agarplatten gelegt (maximal 30 Stück pro Petrischale) und anschließend unter einem kalten Luftstrom (Föhn) getrocknet. Dann wurden jeweils 30 µl Extrakt (E_0 bzw. E_i) auf die Plättchen pipettiert und diese erneut getrocknet. Inzwischen wurden auf eine Petrischale 25 µl Tropfen des jeweiligen Inkubationsmix (12.5 µl 2-fach Energiemix und 12.5 µl H_2O bzw. Hemmstoff, Salzlösung oder Puffer) pipettiert. Zur Inkubation wurden die Cellophanplättchen auf diese Inkubationstropfen gelegt und die Petrischalen in ein 30°C warmes Wasserbad gesetzt. Um ein Austrocknen der Inkubationstropfen (maximal 18 pro Petrischale) zu vermeiden, wurden die Petrischalen sofort mit einem Deckel verschlossen, an dessen Unterseite angefeuchtetes Filterpapier geklebt worden war.

TCA-Fällung der Reaktionsansätze:

Die Reaktionen wurden beendet, indem die Plättchen in Szintillationsröhrchen aus Glas mit 1 ml Stop-Puffer (2.1.2.10.) gebracht und 15 Minuten bei 45°C inkubiert wurden. Danach wurden 4 ml TCA (2 M) zu jeder Probe gegeben und 15 Minuten im Eisbad gefällt. Filtration und Bestimmung der Radioaktivität wurden nach Methode 2.2.5. durchgeführt.

Produktanalyse durch Gradientenzentrifugation:

Mehrere Cellophanplättchen (wenn nicht anders angegeben 10 Stück) wurden nach einer 30-minütigen Inkubation für 15 Minuten in 2.5 ml Tris/EDTA/Brij

bei Raumtemperatur geschüttelt; die DNA ging dabei in Lösung. Ein jeweils in den Legenden angegebenes Aliquot daraus wurde dann durch Bandsedimentation bzw. Dichtezentrifugation analysiert. Da sich gezeigt hatte, daß weder eine, der Produktanalyse vorausgehende Phenolextraktion der Ansätze, noch eine Behandlung mit RNAase T_1 oder A (15 µg/ml, 30 Minuten bei 37°C) und anschließend Proteinase K (50 µg/ml Proteinase K und 0.5 % Sarkosyl, 2 Stunden bei 37°C) einen Einfluß auf die experimentellen Resultate hatten, wurde darauf verzichtet.
Zu beachten war allerdings, daß DNA und Protein weder im Stop-Puffer noch in Tris/EDTA/Brij immer quantitativ von den Cellophanfolien heruntergewaschen werden konnten. Die einzelnen Meßwerte differierten um ca. $\pm$ 10 % und wurden aus diesem Grund mehrfach (meist viermal) bestimmt. Das arithmetische Mittel aus den Meßwerten wurde dann jeweils in die graphische Darstellung bzw. Tabelle eingetragen.

2.2.8. Inkubationsansätze

2.2.8.1. Inkubationsansatz für das TCS und PCS:

75 µl Energiemix, 75 µl Zellen (2×10^9 Zellen plasmolysiert bzw. Toluolbehandelt) und 8 µl H_2O bzw. Hemmer wurden bei 30°C für die jeweils angegebene Zeit inkubiert.

2.2.8.2. Inkubationsansatz für das TCS zur Untersuchung des Effekts von NOV auf die ATP-abhängige Reparatursynthese:

0.1 ml Zellen wurden in 0.3 ml vorgewärmten Energiemix pipettiert und bei 33°C oder 44°C inkubiert.

2.2.8.3. Inkubationsansatz bei Verwendung von Zellextrakten:

140 µl Standardansätze setzten sich zusammen aus 28 µl Energiemix, 87.5 µl Extrakt $\pm$ 7 µl M13 Gen 5-Protein (2.1 mg/ml) $\pm$ 17.5 µl E.coli HD-Protein (0.4 mg/ml). Die Inkubation erfolgte bei 30°C, 20 µl Aliquots wurden jeweils TCA-gefällt (Kinetik).

2.2.8.4. Bei Verwendung des Cellophanfoliensystems erfolgte die Inkubation auf einem Tropfen von 25 µl Energiemix + Hemmer (Puffer, H_2O) wie unter 2.2.7.4. beschrieben. Wurden E.coli HD-Protein oder 5-P zum Extrakt gegeben, so wurden aus einem Ansatz von 50 µl, bestehend aus 44 µl Extrakt und 6 µl E.coli HD-Protein oder (und) 5-P der gewünschten Konzentration jeweils 3 µl auf eine Cellophanfolie gebracht (5-P = M13 Gen 5-Protein).

2.2.9. Inkubationsmix

2.2.9.1. Die Zusammensetzung des Inkubationsmix für das TCS und PCS:

20 mM HEPES·KOH, pH = 8.0, 0.1 M KCL, 10 mM $MgAc_2$, 2 mM ATP, 100 µM NAD, 25 µM dNTP, 50 µM rNTP und 25 µCi ^{3}H-dTTP (30 ci/mmol); alle Angaben sind Endkonzentrationen!

2.2.9.2. Zusammensetzung des Inkubationsmix für 2.2.8.2.:

40 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4,pH = 7.5, 0.1 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 0.1 mM NAD und 25 µM dNTP und ^{32}P-dGTP (spezif. Aktivität 0.5 Ci/mmol, entsprach 1000 cpm/pmol).

2.2.9.3. Zusammensetzung des Inkubationsmix für 2.2.8.3. und 2.2.8.4.:

20 mM HEPES·KOH pH = 8.0, 0.1 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 0.1 mM NAD, 0.05 mM rNTP und 25 µM dNTP und ^{3}H-dTTP mit einer spezifischen Aktivität von 30 Ci/mmol (1 mCi/ml). Ein Einbau von 500 cpm entsprach dabei 1 pmol (siehe auch 2.2.5.).

3. Ergebnisse

3.1. Experimente mit permealisiertem Zellsystem

3.1.1. DNA-Synthese in Toluol-behandelten Zellen und im plasmolysierten Zellsystem:

Für die Optimierung der Infektionszeit boten sich Zellen an, welche durch Toluol-Behandlung (Moses et al. 1970) oder Plasmolyse mit Rohrzucker (Gros et al. 1967, Ben-Hamida et al. 1971) nukleotidpermeabel gemacht worden waren. In derartigen Zellen wurden ursprünglich bakterielle DNA-Replikation und UV-induzierte Reparatursynthese (Masker et al., 1973) untersucht.

Nun können aber beispielsweise nukleotidpermeable E.coli 159-Zellen mit Mitomycin vorbehandelt und dadurch die bakterielle DNA-Replikation vollständig blockiert werden. Sind solche Zellen zuvor mit Phagen infiziert worden, kann deren DNA-Replikation trotzdem unbehindert weiterlaufen (Pratt, D. 1968). Dies erleichtert natürlich die Untersuchung des phagenspezifischen Replikationsprozesses ganz wesentlich (Staudenbauer, W.L., 1973).

Für das folgende Kontrollexperiment wurden zunächst Toluol-behandelte, uninfizierte E.coli 159-Zellen verwendet (2.2.7.) und Standardansätze (2.2.8.1) für 30 Minuten inkubiert. Ein Ansatz wurde ohne, drei weitere Ansätze in Gegenwart von NAL, OXO bzw. NOV inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 20µl Proben entnommen und TCA-gefällt. Während in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3) über 60 pmol dTMP eingebaut wurden, reduzierten NOV und OXO diesen Einbau praktisch gleich effizient auf ca. 12 %, NAL auf ca. 30 % des Kontrollwerts. Eine stärkere Hemmung durch NAL läßt sich auch durch höhere Konzentrationen (über 100 µg/ml) nicht erzielen (Schaller et al., 1972). Die in diesem in vitro System zu beobachtende bakterielle DNA-Synthese war die Voraussetzung für eine Mitomycin-Behandlung und Infektion der Zellen. Zugleich bewies sie, daß die verwendeten Substrate des Energie-Mix in Ordnung waren.

Als nächstes mußte nun einerseits gezeigt werden, daß durch eine Vorbehandlung mit Mitomycin die bakterielle Replikation blockiert wurde und andererseits nach Phageninfektion eine Stimulierung des Einbaus zu verzeichnen war. Sowohl im plasmolysierten, als auch Toluol-behandelten Zellsystem (Abb. 4) hemmte Mitomycin die bakterielle DNA-Replikation

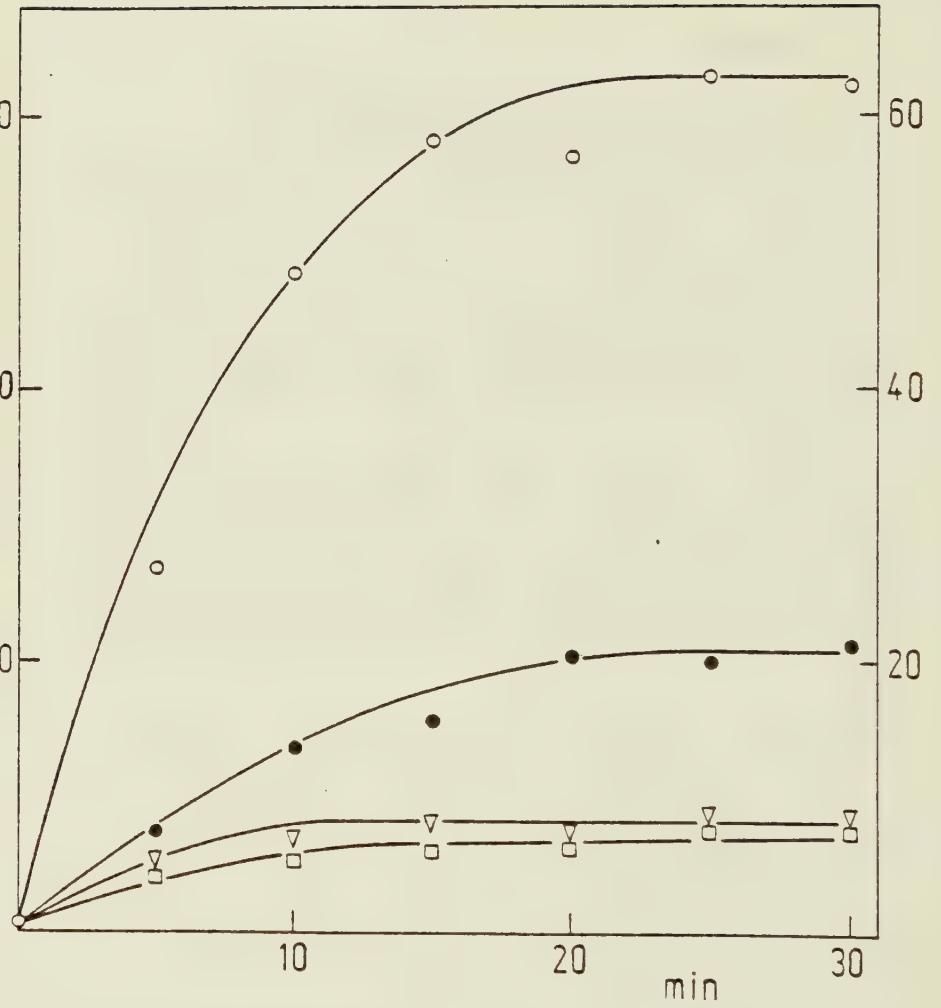


Abb.3: Effekte spezifischer Hemmer der DNA-Replikation auf den Einbau von ^{3}H-dTMP in Toluol-behandelten E.coli 159 Zellen:

Toluol-behandelte Zellen (2.2.7) wurden mit 75 µl Energiemix (2.2.9.1.) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C nach Zugabe von 8 µl H_2O (o——o) bzw. NAL (•——•) bzw. OXO (▽——▽) bzw. NOV (□——□). Die Endkonzentration der Hemmer lag bei 100 µg/ml. Zu den angegebenen Zeiten wurden 20 µl Proben entnommen und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

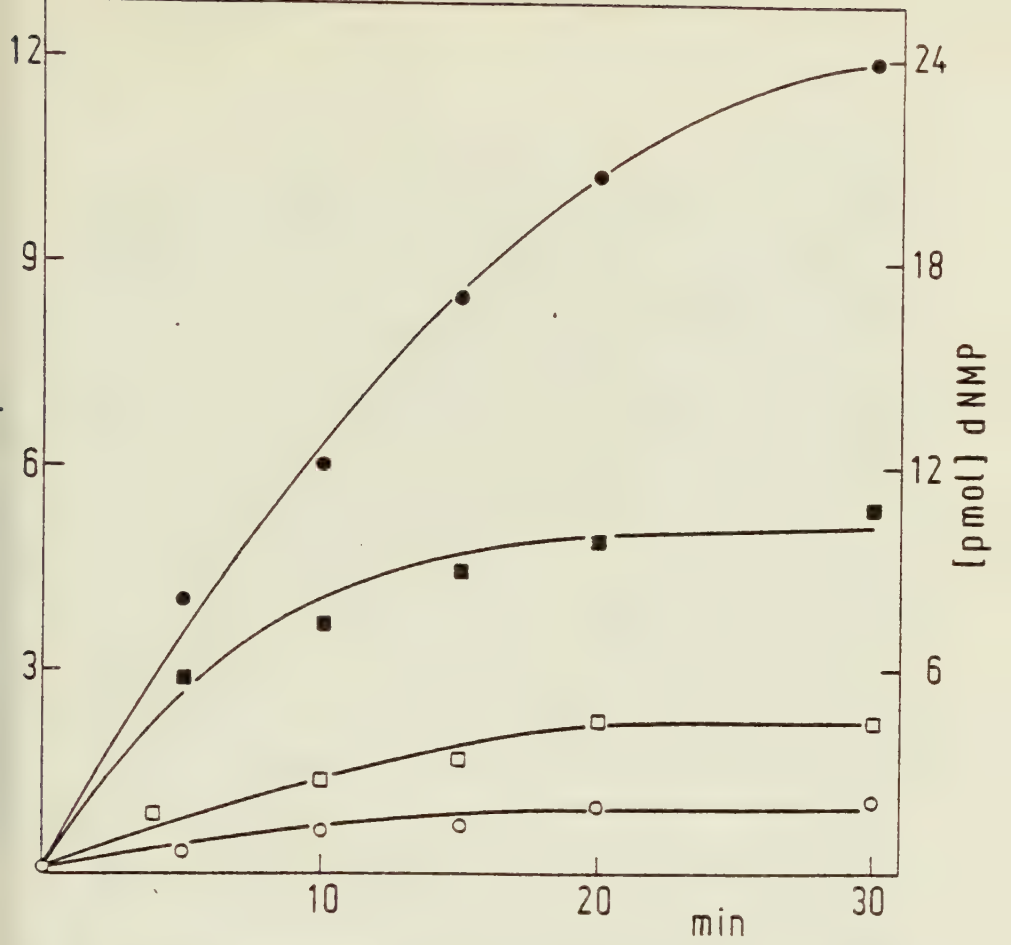


Abb. 4: Stimulierung des Einbaus von ^{3}H-dTMP nach Infektion mit M13 am5 Mitomycin-vorbehandelter anschließender Toluol-behandelter bzw. plasmolysierter Zellen:

E.coli 159 Zellen waren nach Mitomycin-Behandlung mit M13 am5 infiziert worden oder blieben uninfiziert. Die Zellen wurden anschließend Toluol-behandelt oder plasmolysiert (2.2.7.). Jeweils 75 µl Zellsuspension und 75 µl Energiemix wurden bei 30°C inkubiert und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

(o—o) TCS aus Mitomycin-behandelten, uninfizierten Zellen

(•—•) TCS aus Mitomycin-behandelten, M13 am 5 infizierten Zellen (m.o.i. = 20), 20-minütige Infektionszeit

(□—□) PCS aus Mitomycin-behandelten, uninfizierten Zellen

(■—■) PCS aus Mitomycin-behandelten, M13 am5 infizierten Zellen (m.o.i. = 20), 20-minütige Infektionszeit

nahezu vollständig. Da in dem verwendeten TCS die Stimulierung der Synthese nach Phageninfektion bereits deutlich ausgeprägt war, wurde für die Optimierung der Infektionszeit das PCS verwendet. Dazu wurde eine 1l-Kultur E.coli 159 mit Mitomycin vorbehandelt und mit M13 am5 infiziert. Zum Zeitpunkt 0 (Zeitpunkt der Infektion) und nachfolgend alle 10 Minuten wurden jeweils 100 ml entnommen und plasmolysiert. Wie auf Abb. 5 zu sehen ist, wurde bereits nach einer 10- bis 20-minütigen Infektionszeit die maximale Stimulierung der Synthese erreicht, längere Infektionszeiten reduzierten die Einbaurate bereits wieder. Nachdem es bei der M13 WT-infizierten Zelle an sich nicht zur Abschaltung der Wirts-Proteinsynthese kommt, dürfte die Ursache für die Reduktion der Einbaurate auf die hier verwendete M13 am5 Mutante zurückzuführen sein. Diese, wie nahezu alle anderen M13 Mutanten bewirkt nämlich nach einiger Zeit ein "host killing", dessen Mechanismus allerdings noch unklar ist. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Versuche die Zellen nach einer 20-minütigen Infektionszeit geerntet und aufgearbeitet.

Damit waren bereits drei wesentliche Voraussetzungen für die Herstellung eines in vitro Systems zur RF-Replikation von M13 geschaffen:

1. die im Energie-Mix verwendeten Substrate waren in Ordnung;
2. der Stamm E.coli 159 war effizient durch M13 am5 infizierbar;
3. die Phagenreplikation konnte, von der bakteriellen Replikation entkoppelt, unter Benützung von Wirtsenzymen ablaufen und
4. die optimale Infektionszeit war bestimmt.

3.1.2. Charakterisierung des Hemmeffekts von Novobiocin

Novobiocin wurde bisher zu Inkubationsansätzen gegeben, wobei die Hemmbarkeit des Einbaus durch Novobiocin als wesentliches Kriterium einer "echten" DNA-Replikation diente. Es wurde jedesmal stillschweigend vorausgesetzt, daß NOV tatsächlich nur die semikonservative DNA-Replikation hemmt, aber keinerlei Effekt auf alle anderen Arten von DNA-Synthesen habe. Dies mußte jedoch vor einer weiteren Anwendung einmal klar gezeigt werden, ehe man auf die Suche nach einer geeigneten Konzentrierungsmethode für Zellextrakte als dem letzten Schritt zur Etablierung eines funktionierenden in vitro-Replikationssystems ging.

Novobiocin hemmt, wie bereits erwähnt, die DNA-Replikation in nukleotidpermeablen Zellen (Staudenbauer, 1975 und Ryan, 1976) und die Replikation

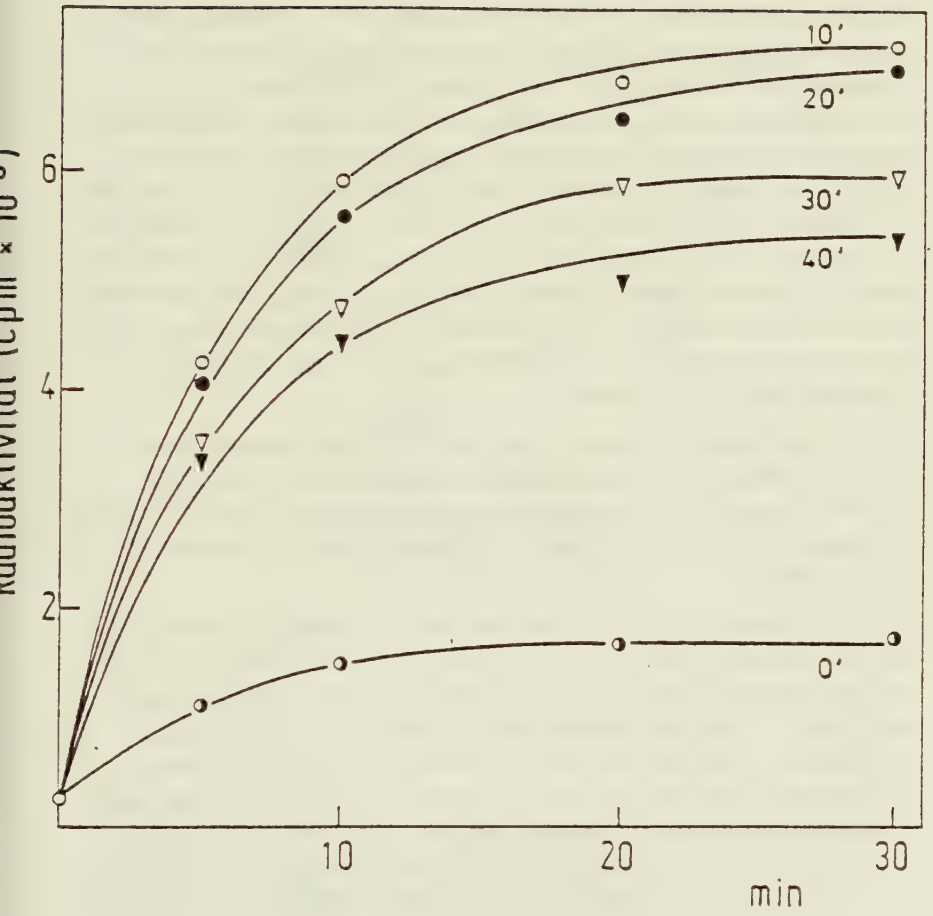


Abb.5: Optimierung der Infektionszeit:

E.coli 159 Zellen wurden Mitomycin-behandelt und mit M13 am5 infiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion (wie auf der Abb. angegeben) wurden 100 µl Zellen entnommen und plasmolysiert (2.2.7.). Die Inkubation erfolgte nach einer 1:1 Verdünnung der Zellen mit dem üblichen Energiemix (2.2.9.1), bei 30°C. Zu den angegebenen Zeiten wurden 20µl Proben entnommen und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

kleiner Plasmide in zellfreien Extrakten (Staudenbauer, 1976 und Gellert, 1976), hat aber auf die von der DNA-Polymerase I durchgeführte ATP-unabhängige Repartursynthese keinen Effekt (Moses, 1970). Daneben besitzen Polymerase I-defiziente Zellen aber einen weiteren, ATP-abhängigen, UV-induzierbaren Reparaturmechanismus (Masker, 1973 und Masker, 1974). Dieser Mechanismus unterscheidet sich von der, ebenfalls ATP-abhängigen DNA-Replikation dadurch, daß er sowohl in dnaB und dnaE Mutanten bei restriktiver Temperatur (Masker, 1973a) funktioniert, als auch durch NAL nicht gehemmt werden kann (Simon et al., 1974). Um sicher zu gehen, daß NOV tatsächlich ein spezifischer Hemmer der semikonservativen DNA-Replikation ist, mußte also die Insensitivität der ATP-abhängigen Reparatursynthese gegenüber NOV (wie für NAL gezeigt) nachgewiesen werden. Man hätte bisher durchaus von der Annahme ausgehen können, daß NOV alle ATP-abhängigen DNA-Synthesen hemmt.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine E.coli polA dnaB Doppelmutante (TG 169) verwendet. Dadurch war gewährleistet, daß bei restriktiver Temperatur weder eine ATP-unabhängige Reparatursynthese (Ausfall von DNA-PolymeraseI), noch DNA-Replikation (thermosensitives dnaB Genprodukt) ablaufen konnten.

Die Zellen wurden in M9-Medium gezogen und anschließend in Phosphatpuffer resuspendiert. Eine Hälfte diente als unbehandelte Kontrolle, die andere wurde mit UV bestrahlt. Dann wurden die Zellen Toluol-behandelt und direkt in einen vorgewärmten Inkubationsmix pipettiert. Wie die Kinetik (Abb. 6) zeigt, erfolgte in unbestrahlten Zellen bei restriktiver Temperatur nur eine geringfügige Synthese, welche nach UV-Bestrahlung signifikant stimuliert wurde. Nach ca. 10 Minuten Inkubationszeit flachte der Einbau ab und erreichte bald ein Plateau. 100 µg/ml Novobiocin hatten auf die Synthese nahezu keinen Effekt, während die DNA-Replikation in dieser Konzentration zu über 90 % gehemmt wird (Staudenbauer, 1975). Auf der Tabelle 1 sind die Ergebnisse, welche in Gegenwart verschiedener Novobiocin-Konzentrationen erzielt wurden, zusammengefaßt. Die ATP-abhängige Reparatursynthese wurde selbst durch 500 µg/ml NOV nur unerheblich beeinflußt. Hierbei dürfte es sich allerdings nur um Sekundäreffekte handeln, die in keiner Beziehung zum Hemmechanismus der DNA-Replikation stehen.

TABELLE 1:

SYSTEM	^{32}P-dGTP EINBAU (%)
KOMPLETT	100
-ATP	22
+NAL (100 µg/ml)	91
+OXO (50 µg/ml)	94
+NOV (20 µg/ml)	94
+NOV (100 µg/ml)	88
+NOV (500 µg/ml)	85

UV-stimulierte Reparatursynthese in Toluol-behandelten E-coli TG 169 Zellen:

Der unter Abb.6 beschriebene Ansatz wurde für 30 Minuten bei 44°C inkubiert, anschließend die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt. 100 % Einbau entsprechen 24.6 pmol dGMP-Einbau in 3 x 10^9 Zellen.

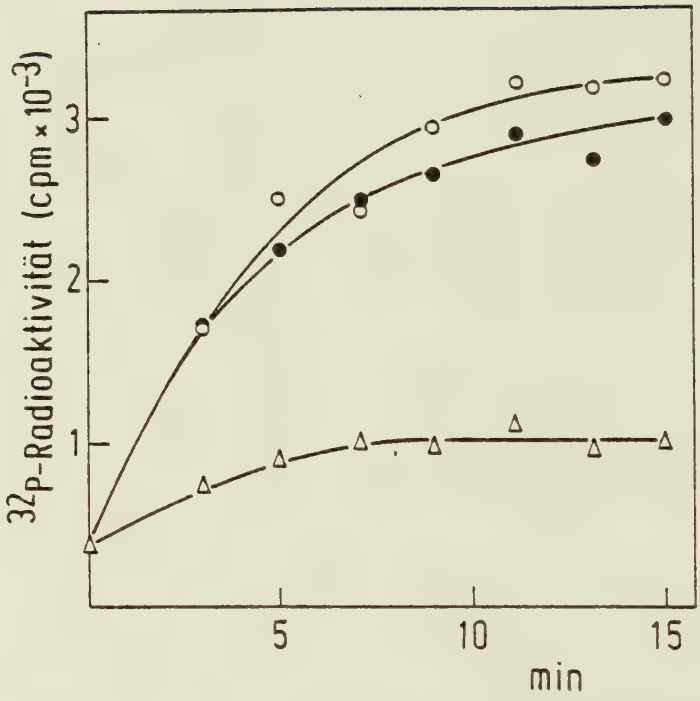


Abb.6: Kinetik des ^{32}P-dGMP Einbaus durch Toluol-behandelte E.coli 159 Zellen:

0.2 ml einer Toluol-behandelten Zellsuspension (3 x 10^9 Zellen) wurden in o.3 ml eines vorgewärmten Energiemix (2.2.9.2.) pipettiert und bei 44°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 50 µl Proben entnommen und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

(o—o) UV-bestrahlte Zellen;

(•—•) UV-bestrahlte Zellen plus 100 µg/ml Novobiocin

(▽—▽) unbestrahlte Kontrolle

Diese Resultate konnten durch eine Produktanalyse mit Hilfe der Gleichgewichtszentrifugation in neutralen und alkalischen CsCl-Gradienten bestätigt werden.

Wie die Produktanalyse durch Zentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten zeigte, wurde die semikonservative DNA-Replikation in unbestrahlten TG169 Zellen bei permissiver Temperatur (Abb. 7A) durch die Zugabe von 100µg NOV/ml (Abb. 7B) oder eine Temperaturerhöhung auf 44°C (Abb. 7C) vollständig gehemmt. Der UV-stimulierte Einbau, welcher bei 44°C beobachtbar war (Abb. 7D), konnte durch Weglassen von ATP auf den Resteinbau der unbehandelten Kontrolle bei restriktiver Temperatur reduziert werden (Abb. 7E). Die Zugabe von NOV hatte, wie auch auf Abb. 6 erkennbar, keinen Hemmeffekt (Abb. 7F).

Die nach UV-Bestrahlung aus der E.coli DNA enzymatisch herausgeschnittenen und dann neusynthetisierten Abschnitte sind relativ kurz, verglichen mit Fragmenten, welche man durch Beschallung der DNA erhalten kann (Cooper, 1972). Enthalten solche, durch Beschallung hergestellten Fragmente reparierte, mir BrdUTP dichtemarkierte Abschnitte, wird folglich nur eine unwesentliche Dichteveränderung dieser DNA resultieren. Auf diese Art und Weise können Replikation und Reparatursynthese klar voneinander unterschieden werden:

Replizierte DNA bandiert in entsprechenden Gradienten nach BrdUTP-Markierung bei Hybriddichte (Meselson et al., 1958).
Für die Untersuchung der Produkte durch Gleichgewichtszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten wurden zwei Standardansätze mit und ohne NOV inkubiert und die DNA anschließend intensiv beschallt. Dabei resultierten Fragmente mit einem MG von ca. 0.5 - 0.8 x 10^6 Dalton, die gegenüber der Referenz-DNA nur eine unwesentliche Dichteverschiebung aufwiesen. NOV hatte keinerlei Einfluß auf das Dichteprofil (Abb.8).

Wie vor kurzem von Gellert gezeigt werden konnte, hemmt NOV in einer ATP-abhängigen Reaktion die DNA-Gyrase, ein Enzym, welches negative superhelikale Windungen in die geschlossen zirkuläre DNA einführt (Gellert et al., 1976 und Gellert et al., 1976a). Die Autoren vermuteten, daß derartige superhelikale Windungen die Voraussetzung zur Initiation der Replikation darstellten. Für die Reparatursynthese sind diese Strukturen aber offensichtlich nicht notwendig. Dies würde auch die Insensitivität der Reparatursynthese gegenüber NOV, sowohl in quantitativer (Abb. 6 und Abb. 7F) als auch qualitativer Hinsicht (Abb. 8), erklären. Damit war gezeigt, daß ein Hemmeffekt durch NOV als eindeutiges Kriterium für semikonservative DNA-Replikation benützt werden konnte.

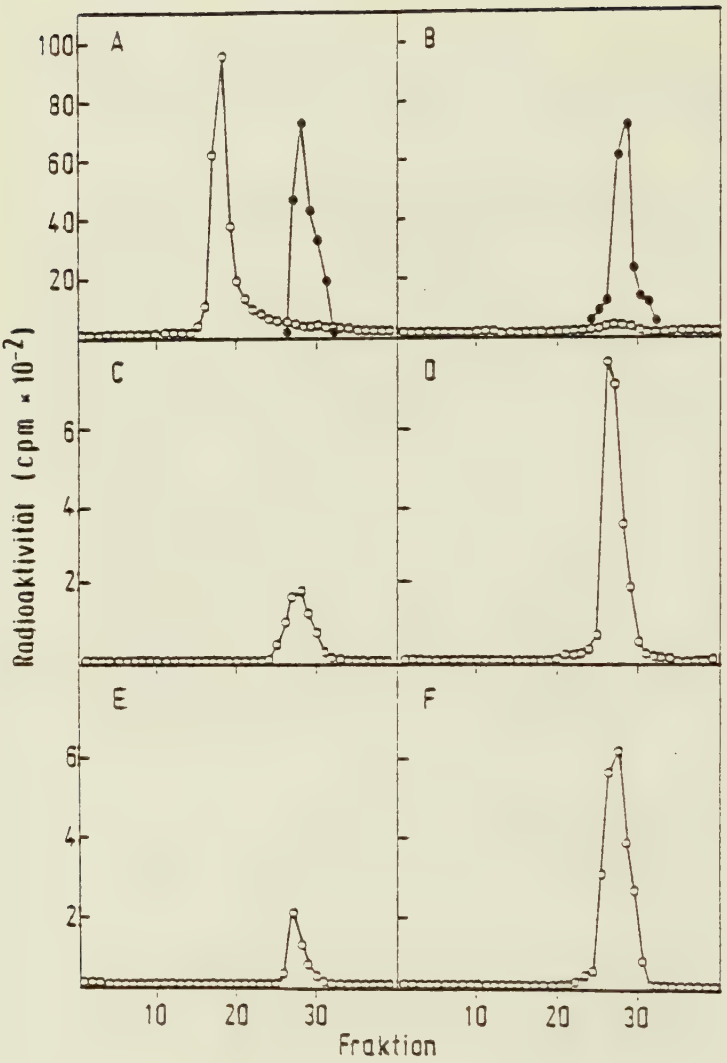


Abb.7: Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten:

Standardinkubationsansätze von 0.5 ml (siehe Abb.6), in denen dTTP durch BrdUTP ersetzt worden war, wurden 30 Minuten bei 33°C (A und B) bzw. bei 44°C (C bis F) inkubiert. Novobiocin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben (B und F). Die Zellen wurden lysiert und in neutralen CsCl-Gradienten (5.2 gr CsCl in 4 gr TEN) 40^h bei 40.000 upm zentrifugiert.

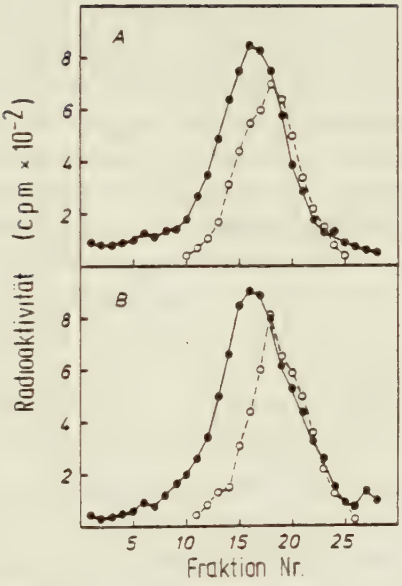


Abb.8: Gleichgewichtszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten:

UV-bestrahlte, Toluol-behandelte Zellen (0.4 ml) wurden in Standardansätzen (Abb. 7) von insg. 1.0 ml für 30 Minuten bei 44°C in Abwesenheit (A) oder Gegenwart von 100 µg/ml Novobiocin (B) inkubiert. Die reparierte DNA parentaler Dichte wurde, wie unter Abb. 7 beschrieben, isoliert und in einem Beschaller von Bronson Instruments 2 Minuten intensiv geschert (unter Kühlung auf 0°C). Der Schergrad wurde nach der von Studier beschriebenen Methode (Studier, 1965) durch Sedimentationszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten (2.2.4.) bestimmt. Die gescherte DNA wurde in alkalischen CsCl-Gradienten (0.2 M NaOH) 40^h bei 40.000 upm zentrifugiert. Die Dichte nimmt von rechts nach links zu.
(o——o) ^{3}H-prämarkierte DNA; (•——•) ^{32}P-markierte, reparierte DNA

3.1.3. Kurze Zusammenfassung der bisherigen Resultate:

Die zur Untersuchung der RF-Replikation von M13 benötigten Wirtszellen, Phagen und Materialien waren in zwei gut funktionierenden in vitro Systemen (TCS, PCS) getestet worden. Einerseits die in Mitomycin-behandelten, uninfizierten, andererseits die in Mitomycin-behandelten, M13 am5 infizierten und plasmolysierten Zellen ablaufende DNA-Synthese hatte gezeigt, daß sowohl die Bakterien.- und Phagenstämme, als auch die zur Herstellung der Inkubationsgemische verwendeten Substrate in Ordnung waren.

Zusätzlich erwies sich Novobiocin als absolut spezifischer Hemmer der semikonservativen DNA-Replikation. Es konnte klar gezeigt werden, daß Novobiocin keinen Effekt auf die ATP-abhängige und an einer doppelsträngigen Matritze ablaufende Reparatursynthese hatte. Eine Hemmbarkeit durch NOV konnte somit als sicheres Kriterium für eine "echte" DNA-Replikation herangezogen werden.

3.2. Das Cellophanfoliensystem

3.2.1. Test des Membranfoliensystems nach Schaller für die RF-Replikation von M13

Die richtige Konzentration der an der DNA-Replikation beteiligten Proteine stellt sicher einen entscheidenden Parameter bei der Herstellung funktioneller in vitro Systeme dar; dies bedeutet, möglichst die Proteinkonzentrationen zu erhalten, welche auch in der lebenden Zelle vorliegen. Diese werden in Rohlysaten mit Sicherheit nicht erreicht. Und selbst nach einer Konzentrierung der Proteine durch eine Ammoniumsulfat-Fällung bleibt zu bezweifeln, daß die in der Zelle herrschende lokale Konzentration, beispielsweise der an der Replikation beteiligten Enzyme, erreicht wird.

Eines der am besten funktionierenden in vitro Systeme wurde ursprünglich von Schaller und Bonhoeffer beschrieben (Schaller et al., 1972): das sogenannte Membranfoliensystem. Die Vorzüge dieses Symstems liegen darin, daß nach schonender Lyse von Bakterienzellen auf einem Plättchen aus Einmachfolie alle makromolekularen Komponenten in sehr hoher Konzentration erhalten bleiben. Dies war der Anlaß zu versuchen, das Membranfoliensystem für die RF-Replikation von M13 einzusetzen. Aus diesem Grund wurden E.coli 159 Zellen gezogen und anschließend zur Untersuchung der bakteriellen

Replikation behandelt. Anschließend wurde eine Hälfte der Kultur mit M13 am5 infiziert, die andere blieb uninfiziert. Die Lyse der Zellen, sowie die Inkubation der Versuchsansätze erfolgten nach der von Schaller beschriebenen Methode.

Diese Methode erwies sich aber bedauerlicherweise für die Untersuchung der M13-Replikation als ungeeignet, da die Zellen zeitlich unkontrollierbar lysierten und auch die Verwendung verschiedener Lysemixe darauf keinen Einfluß hatte. Außerdem lagen die erzielten dNTP-Einbauten maximal bei nur 8 pmol pro 15 Minuten Inkubationzeit und 25 µl Probe, wobei praktisch keine Unterschiede bei der Verweundung von Lysaten aus uninfizierten und solchen aus infizierten Zellen auftraten. Die Synthese konnte weder durch Zugabe von M13 RFI stimuliert, noch durch spezifische Hemmer wie OXO oder NOV inhibiert werden. Und schließlich trat nach Inkubationszeiten von ca. 15 Minuten eine Degradation der neusynthetisierten DNA ein. Das Membranfoliensystem nach Schaller schied damit als mögliches in vitro System zur M13 RF-Replikation aus.

3.2.2. Konzentrierung von Extrakten aus M13 am5 infizierten Zellen auf Membranfolien:

Die Konzentrierung von Extrakten aus M13 am5 infizierten Zellen auf Membranfolien war der entscheidende Schritt zur Etablierung des gewünschten in vitro Systems. Im Prinzip war es die sinnvolle Verknüpfung zweier wichtiger Standardmethoden: Einerseits wurden die Extrakte nach der von Wickner beschriebenen Methode hergestellt (Wickner, W.T., 1972; Wickner, W.T., 1972a; Schekman, R., 1972) und andererseits nach der von Schaller et al. - allerdings für uninfizierte Zellen - beschriebenen Membranfolienmethode (Schaller, 1972) konzentriert.

Wie unter 2.2.7. beschrieben, wurden drei Parallelansätze hergestellt und eine Einbaukinetik durchgeführt. Ein Ansatz diente dabei als Kontrolle, zu den beiden anderen Ansätzen wurde Rifampicin (50 µg/ml) bzw. Oxolinsäure (100 µg/ml) gegeben. Wie auf Abb.9 zu sehen, erfolgt ein linearer Einbau von ^{3}H-dTMP über nahezu 15 Minuten, der nach einer ca. 20-minütigen Inkubationszeit in ein Plateau übergeht. In Gegenwart von Rifampicin wurden nur 30 %, in Gegenwart von Oxolinsäure ca. 15 % des Einbaus im Kontrollansatz erzielt.

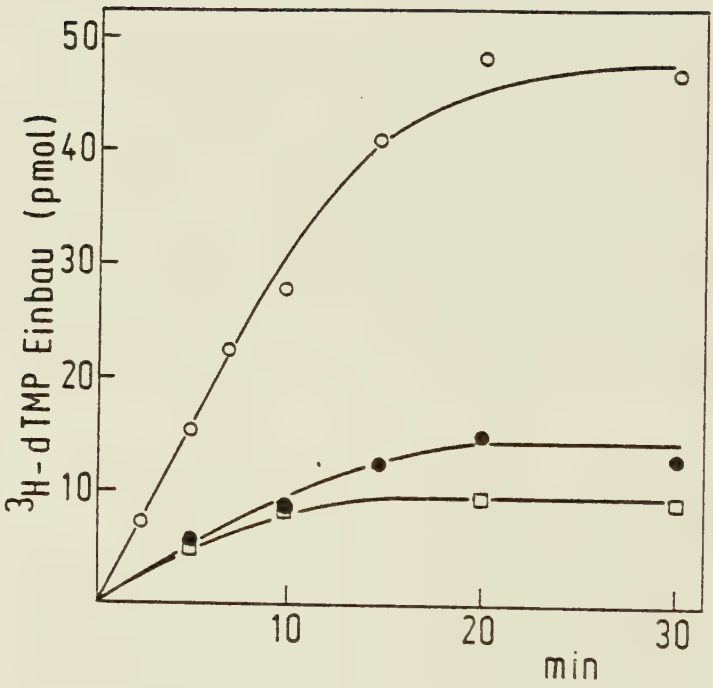


Abb.9: Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP:

Extrakte aus M13 am5 infizierten Zellen (3 µl/Plättchen) wurden auf Cellophanplättchen konzentriert und auf einen Inkubationstropfen von 25 µl transferiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 3 Plättchen auf die TCA-fällbare Radioaktivität hin gemessen.
(o——o) Kontrolle; (•——•) plus Rifampicin (50 µg/ml);
(□——□) plus Oxolinsäure (100 µg/ml).

Unter Berücksichtigung der Substratkonzentration ergab sich in der Kontrolle eine Einbaurate von 65 pMol dTMP pro Minute und Milligramm Protein.

3.2.3. Die Charakterisierung des Systems

Die Einbaurate lag überraschend hoch und war möglicherweise nicht nur auf eine "echte" Replikation zurückzuführen. Hier hätten unspezifische Synthesen oder Reparatursynthesen ebenso beteiligt sein können.

Es war deshalb wichtig, das System näher zu charakterisieren. Dies geschah zunächst einmal durch die Bestimmung der für den Einbau essentiellen Substrate und zum anderen durch die Untersuchung der Effekte verschiedener spezifischer Hemmer von Replikation und Transkription auf die beobachtete Reaktion.

Zunächst wurden Standardansätze (30 Minuten bei 30°C) inkubiert, die sich jeweils nur durch das Auslassen oder den Zusatz eines der in Tabelle 2 angegebenen Substrate unterschieden. Jeder Ansatz wurde 3-fach durchgeführt und die Werte gemittelt. Auf der Tabelle 2 sind die entsprechenden Resultate aufgeführt:
Für das System erwiesen sich sowohl Magnesium als auch Kalium als essentiell, wobei Kalium auch nicht durch Natrium ersetzbar war. Ebenso war die Zugabe von ATP, dem bedeutensten Energielieferanten der Zelle, absolut notwendig. Das Auslassen der Ribonukleosidtriphosphate und, wie zu erwarten, besonders das Weglassen von Desoxyribonukleosidtriphosphaten reduzierten den Einbau auf 79 % bzw. 36 % des Kontrollwerts. Daß unter diesen Bedingungen dennoch diese Einbaurate von ^{3}H-dTMP erzielt wurde, muß mit den in der Zelle stets vorhandenen, endogenen Nukleosidtriphosphaten erklärt werden.

Oberraschenderweise reduzierte Spermidin, ein biogenes Amin, bei einer Konzentration von 5 mM den Einbau um 53%. In den von Schekman und Wickner beschriebenen in vitro Systemen zur Umwandlung einzelsträngiger ØX174 DNA in die replikative Form (RFI) hatte sich Spermidin ebenso stimulierend erwiesen, wie auf die Aktivität gereinigter DNA-Polymerasen (Wickner, W.T., 1972, Schekman, R., 1972; Chiu, J.F., 1972).

Die Zugabe von hochgereinigter M13 RFI DNA (1µg/ml) bewirkte keine Erhöhung des Einbaus. Da auch die Erhöhung der Substratkonzentration keine Stimulierung der Syntheserate gebracht hatte, war damit indirekt gezeigt, daß die Konzentration der Replikationsproteine im Extrakt der limitierende Faktor für die Synthesekapazität darstellte.

TABELLE 2:

REAKTIONSBEDINGUNGEN	^{3}H-dTMP EINBAU (%)
KOMPLETT	100
-KCL	37
-KCL +NaCL	29
-$MgCl_2$	0
-ATP	2
-CTP -GTP -UTP	79
-NAD	108
-dATP -dCTP -dGTP	36
+SPERMIDIN	47
+RFI DNA	98

Charakterisierung des Systems:

Pro Meßpunkt wurden 3 Ansätze, wie unter 2.2.7. beschrieben, bei 30°C inkubiert. Das in der Tabelle aufgeführte Substrat wurde gegenüber dem üblichen Energiemix (2.2.9.3.) weggelassen oder zugesetzt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus der TCA-fällbaren Radioaktivität von je 3 Plättchen errechnet worden und angegeben.

Wie bereits erwähnt, eignen sich spezifische Hemmer der Replikation und der Transkription sehr gut zur Charakterisierung der in vitro DNA-Replikation. Aus diesem Grund wurden Standardansätze (30 min, 30°C) inkubiert und die TCA-fällbare Radioaktivität von jeweils 4 Plättchen bestimmt. Ein Ansatz diente als Kontrolle, zu den anderen wurden die auf Tabelle 3 angegebenen Hemmer zugesetzt.

TABELLE 3:

HEMMER	^{3}H-dTMP EINBAU (%)
-	100
+RIF (50 µg/ml)	29
+STR (50 µg/ml)	55
+STR (500 µg/ml)	35
+OXO (50 µg/ml)	9
+NAL (50 µg/ml)	17
+NOV (10 µg/ml)	26
+ACTP (0.5 mM)	2
+PCMB (1.0 mM)	3
+PAA (1mg/ml)	35

Effekte spezifischer Hemmer auf die Synthese im Cellophanfoliensystem:

Es wurden die üblichen Ansätze (2.2.7.), 4-fach pro Wert, bei 30°C für 30 Minuten inkubiert. Die Mittelwerte sind in der Tabelle aufgeführt.

Man erkennt, daß Nalidixinsäure, Oxolinsäure und Novobiocin bei den verwendeten Konzentrationen die DNA-Synthese im erwarteten Maß gehemmt hatten. In zwei weiteren Ansätzen wurden Cytosin-arabinosidhydrochlorid bzw. p-Chloromercuribenzoesäure eingesetzt. Beide bewirkten eine vollständige Hemmung der Synthese. Damit war gezeigt, daß es sich hierbei nicht um eine Reparatursynthese durch die DNA-Polymerase I gehandelt haben konnte: Sowohl aCTP (Rama Reddy, 1971) als auch PCMB - ein SH-Blocker - hemmen nur die DNA-Polymerasen II und III (Schneck et al., 1975). Die Polymerase II und (oder) III waren also an der beobachteten Synthese beteiligt gewesen, eine Reparatursynthese durch Polymerase I somit ausgeschlossen.
Ferner wurde die Reaktion effizient durch die beiden verwendeten Hemmer der RNA-Polymerase, Rifampicin und Streptolydigin gehemmt (Goldberg, J.H., 1971); es mußte sich also um eine echte DNA-Replikation gehandelt haben.

Zur Oberprüfung der Versuchsbedingungen und ihrer eventuellen Optimierung wurden einige ausgewählte Optima bestimmt, wenngleich nicht anzunehmen war, daß sich das hier beschriebene System wesentlich von den bisher verwendeten in vitro Systemen unterschied.
Erneut wurden die üblichen Standardansätze 30 min bei 30°C inkubiert und für jeden Meßpunkt die TCA-fällbare Radioaktivität von jeweils 4 Plättchen bestimmt. Die entsprechenden Mittelwerte sind auf der Abb. 10 eingetraten. Während sich für die Mg-Konzentration bei 10 mM (Abb. 10A) und für den pH-Wert bei pH = 7.0 (Abb. 10C) jeweils scharfe Optima ergaben, wurden bei KCl-Konzentrationen von 80 mM bis 150 mM nahezu gleiche Einbauraten erzielt. In jedem Fall hatte sich gezeigt, daß die bisher verwendeten Konzentrationen bzw. der pH-Wert optimal eingestellt worden waren. Sehr ähnliche bzw. identische Werte wurden im übrigen bei allen in unserem Labor verwendeten in vitro Systemen (TCS, PCS, Rohlysate, Membranfolien nach Schaller et al.)eingestellt und scheinen den physiologischen Bedingungen der Zelle wohl am nächsten zu kommen.

3.2.4. Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation im neutralen CsCl-EtBr-Gradienten

Eine wesentliche Methode, um zu einer qualitativen Aussage zu kommen, ist seit langem die Produktanalyse mit Hilfe der verschiedenen Zentrifugationstechniken. Eine erste Vorstellung über die auf den Plättchen synthetisierten Produkten sollte durch eine Gleichgewichtszentrifugation in einem neutralen CsCl-EtBr-Gradienten gewonnen werden.

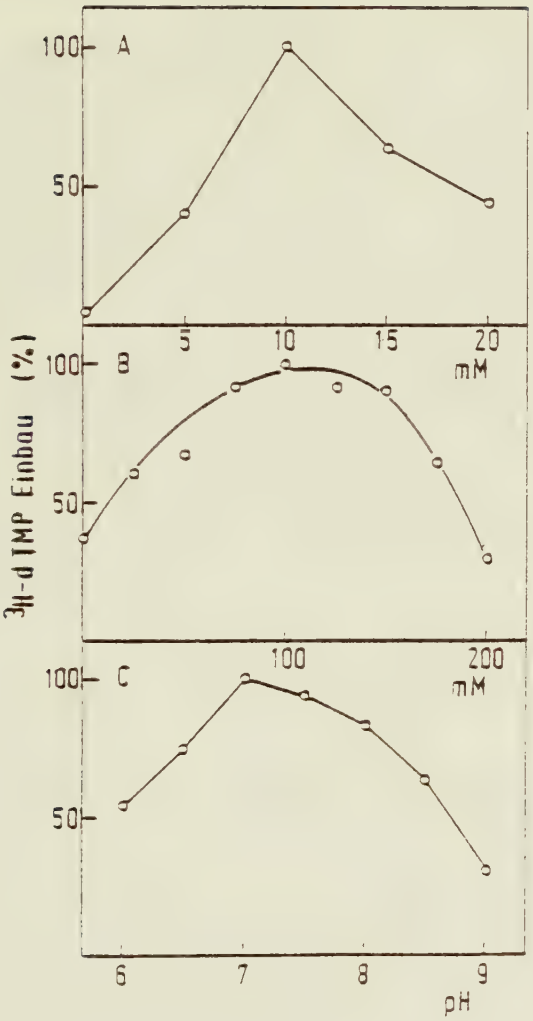


Abb. 10: Bestimmung des K^+, Mg^{++} und pH-Optimums:

Standardansätze (2.2.7.4.) wurden für 30 min bei 30°C inkubiert. Der Energiemix (2.2.9.3.) wurde, mit Ausnahme der drei angegebenen Parameter, unverändert beibehalten. Jeder Meßpunkt wurde 4-fach bestimmt.
(A) Mg-Optimum; (B) K-Optimum; (C) pH-Optimum

Insgesamt 10 Plättchen (Standardansätze) wurden 30 min bei 30°C inkubiert, wie unter 2.2.7. beschrieben, aufgearbeitet, anschließend zentrifugiert und fraktioniert. Aus der Abb. 11A ist zu ersehen, daß der weitaus größte Anteil eingebauter, TCA-fällbarer Radioaktivität mit der eingesetzten Referenz-DNA bei der Dichte von kovalent geschlossener, zirkulärer M13 RFI DNA kobandierte. Nur ein unwesentlicher Anteil der Markierung bandierte in der Position offen zirkulärer RFII Moleküle und entsprechend geringerer Dichte. Solche RFII Moleküle sind als Intermediate der Replikation immer zu erwarten.

Zum besseren Verständnis sei kurz erwähnt, daß Äthidiumbromid zu den interkalierenden Farbstoffen gehört. Interkalation führt in einem Kovalent geschlossenen DNA Doppelstrang zu positiver Superhelizität, welche der weiteren Farbstoffbindung entgegen wirkt. Die negative Superhelizität des RFI begünstigt folglich zunächst die Interkalation. Aus diesem Grund können RFII-Moleküle ohne Superhelizität wesentlich mehr Farbstoff binden, als die RFI DNA mit ihren starken superhelikalen Windungen (Tertiärstruktur). Da aber die Bindung des Äthidiumbromids an die DNA zu einer drastischen Erniedrigung der Dichte führt, bandieren RFII Moleküle bei der entsprechend geringeren Dichte im Gradienten als dies für RFI Moleküle gilt (Crawford, L.V. 1967).

3.2.5. Bandsedimentation Hind II verdauter Produkte in alkalischen CsCl-Gradienten

Die Gleichgewichtszentrifugation im neutralen CsCl-EtBr-Gradienten hatte ergeben, daß die Syntheseprodukte eine einheitliche Bande mit der als Referenz eingesetzten M13 RFI DNA bildeten. Um eine exakte qualitative Aussage machen zu können, wurden Standardansätze inkubiert und insgesamt 4 Plättchen 30 min bei 30°C verwendet. Durch eine Behandlung mit 200 µl Sarkosyl (0.5 %) und NaOH (0.2 M) wurde die DNA von den Plättchen gewaschen und die Lösung gleichzeitig alkalisiert. Die Probe wurde in einem alkalischen CsCl-Gradienten der Dichte 1.2 - 1.4 zentrifugiert (2.2.4.). Der Gradient wurde fraktioniert, die TCA-fällbare Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. Abb. 11 B gibt das Ergebnis wieder:
Der weitaus größte Teil der ^{3}H-markierten Syntheseprodukte sedimentierte sehr rasch, wie es für die denaturierte Form I DNA zu erwarten war. Ein relativ kleiner Prozentsatz TCA-fällbarer Radioaktivität bandierte mit der als Sedimentationsmarker verwendeten ^{32}P-SS-DNA von M13.

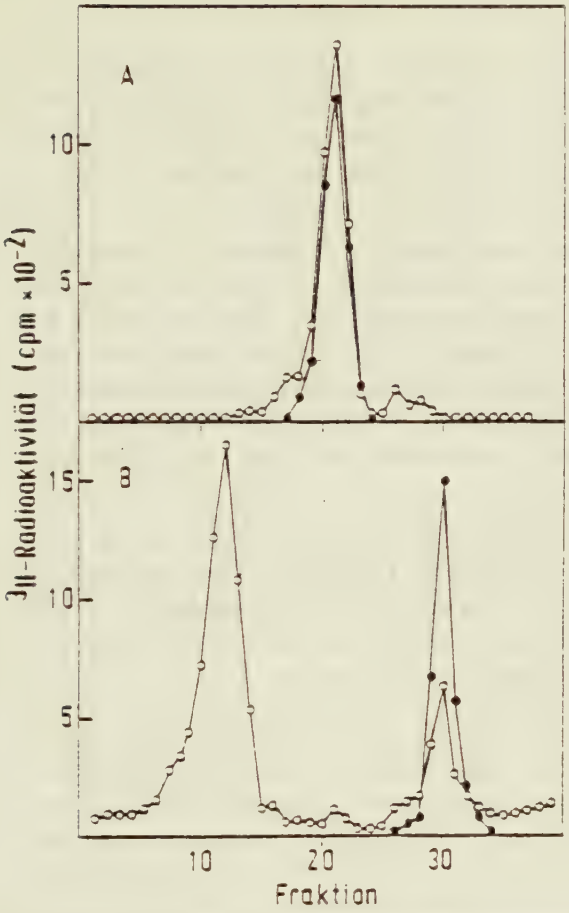


Abb.11: Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation im neutralen CsCl-EtBr-Gradienten (Abb. 11A) und durch Bandsedimentation im alkalischen CsCl-Gradienten (Abb. 11B).

Insgesamt 10 Plättchen wurden unter Standardbedingungen inkubiert, die DNA heruntergewaschen und in einem neutralen CsCl-EtBr-Gradienten (4.8 gr CsCl, 2.5 gr EtBr (1 mg/ml), 2.5 gr Probe in TEN-Puffer) zentrifugiert (40^h, 40.000 upm). (A)!

Zur Analyse durch Sedimentationszentrifugation (CsCl der Dichte 1.2 - 1.4) wurden die Syntheseprodukte von 4 Plättchen nach 2.2.7 aufgearbeitet und 1^h bei 45000 upm im Spinco Ti 56 Rotor zentrifugiert. Sedimentationsrichtung von rechts nach links.

(•——•) ^{32}P-markierte RFI-DNA (A) bzw. SS-DNA (B)

(o——o) ^{3}H-dTMP-markierte, neusynthetisierte RFI-DNA

Hierbei handelte es sich um denaturierte RFII Moleküle, deren "+"- und "-"-Stränge durch die Alkalibehandlung getrennt worden waren und somit in die Position von einzelsträngiger DNA gelangten; intakte RFII Moleküle werden also in alkalischen Gradienten aufgeschmolzen und folglich nicht vorgefunden (Kronberg, A., 1974).

Wurden die entsprechenden Versuchsansätze in Gegenwart von Oxolinsäure, Novobiocin oder Rifampicin durchgeführt, änderte sich das Profil der Gradienten grundlegend (keine graphische Darstellung). Während in der Position von RFI und SS-DNA (denat. RFII) praktisch keine TCA-fällbare Radioaktivität aufzufinden war, erschienen bei allen drei Gradienten in den obersten fünf (von insgesamt 40) Fraktionen sehr kleine, radioaktiv markierte Fragmente, welche in Gegenwart der Hemmer noch synthetisiert worden waren.

In einem weiteren, identischen Ansatz wurde die RFI DNA nach der Inkubation von den Plättchen gewaschen und zunächst in einem neutralen CsCl-EtBr Gradienten (2.2.4.) gereinigt, die entsprechenden Fraktionen gesammelt, dialysiert und anschließend mit der Restriktionsendonuklease Hind II verdaut. Die von Hind II erkannte Sequenz

(5'G T Py Pu A C 3')
. . . . . .
(3'C A Pu Py T G 5')

erscheint in M13 RFI Molekülen nur einmal (Takanami, 1975; Shen, 1976; V.d. Hondel, 1973; V.d. Hondel, 1976) und führt zu einem Doppelstrangbruch. RFI-Moleküle werden dadurch in einen linearen Duplex (RF III) umgewandelt. Bei einer nachfolgenden Sedimentationszentrifugation in einem alkalischen CsCl-Gradienten hätte folglich die gesamte TCA-fällbare Radioaktivität in der Position von Einzelstrang-DNA auftauchen müssen. Wie auf Abb. 11 C dargestellt, war dies auch der Fall. Die geringe Verschiebung der M13 SS-DNA (zirkuläre Marker-DNA) gegenüber dem Syntheseprodukt (lineare Einzelstränge), resultiert aus dem höheren Sedimentationskoeffizienten der zirkulären SS-DNA. Man konnte jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit sagen, daß es sich bei den synthetisierten Produkten um intakte RFI Moleküle gehandelt hatte.

3.2.6. Strangtrennung durch Gleichgewichtszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten

Replizieren DNA-Moleküle in Gegenwart radioaktiv markierter Substrate, so weisen nach einer Replikationsrunde jeweils die neusynthetisierten

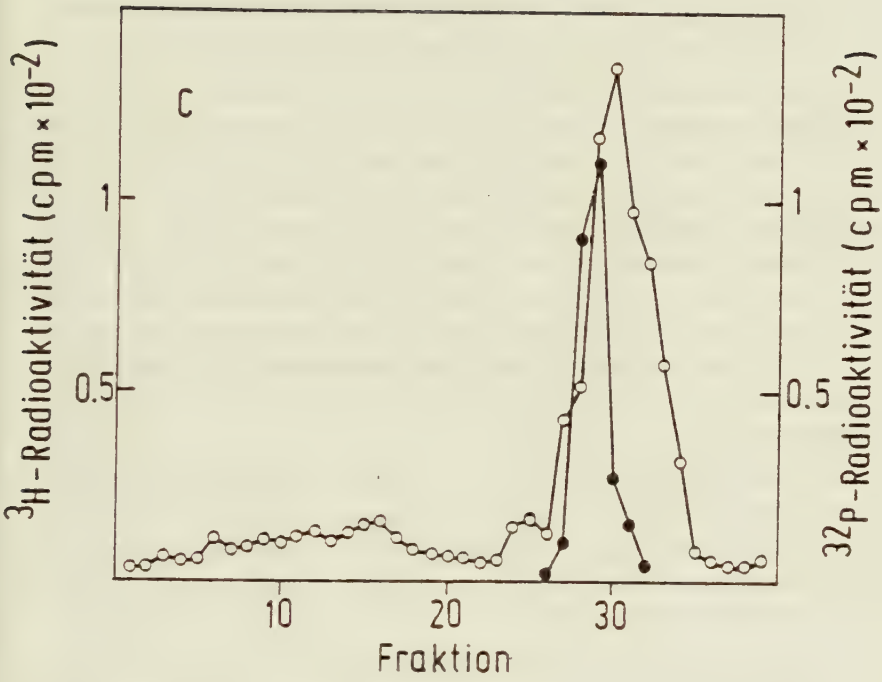


Abb.11C: Produktanalyse durch Bandsedimentation in alkalischen CsCl-Gradienten. Hind II Verdau des Syntheseprodukts.

Wie unter Abb. 11B beschrieben, wurden 4 Plättchen 30 min bei 30°C unter Standardbedingungen inkubiert, die DNA anschließend über einen neutralen CsCl-EtBr-Gradienten (2.2.4.) gereinigt, die DNA dialysiert und anschliessend mit der Restriktionsendonuklease Hind II (in 50 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH = 7.5, Mercaptoäthanol 6 mM) in Gegenwart von 6 mM $MgCl_2$ 30 min bei 30°C inkubiert. Zentrifugation in einem CsCl-Gradienten der Dichte 1.2 - 1.4 bei 40.000 upm und 8°C. Sedimentation von rechts nach links.
(o——o) ^{3}H-dTMP-markierte, neusynthetisierte DNA;
(•——•) ^{32}P-SS-Marker-DNA

"+"- oder "-"-Stränge eine Markierung auf. Die in einem Standardansatz synthetisierte RFI DNA wurde durch Zentrifugation in einem CsCl-EtBr-Gradienten isoliert. Die entsprechenden Fraktionen wurden nach der Zentrifugation dialysiert und mit der Restriktionsendonuklease Hind II (wie bereits beschrieben) verdaut. Das Material wurde anschließend über einen alkalischen CsCl-Gradienten ins Gleichgewicht zentrifugiert.

Unter diesen Bedingungen werden Viralstrang- und Komplementärstrang-DNA getrennt und bandieren bei leicht unterschiedlichen Dichten von 1.763 bzw. 1.748 g/ml aufgrund ihres unterschiedlichen G+T-Gehalts (Ray 1969). Das Dichteprofil des Gradienten ist auf Abb. 12 A dargestellt. Es ist zu erkennen, daß beide Stränge neu synthetisiert und somit markiert waren. Es wird aufgefallen sein, daß der Einbau von ^{3}H-dTMP nicht gleichmäßig auf den Dichtebereich von Viralstrang.- und Komplementärstrang-DNA verteilt zu sein scheint. Wenn man jedoch berücksichtigt, daß in den Viralsträngen von M 13 ein ca. 1.54-fach höherer Anteil von Thymin-Basen als in den Komplementärsträngen vorliegt, wird dieser Unterschied (Markierung mit ^{3}H-dTTP) verständlich.

In einem Parallelansatz wurde zusätzlich Rifampicin zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte ansonsten genau gleich. Aus der Abb. 12 B ist zu ersehen, daß die neusynthetisierte DNA mit der als Referenz eingesetzten Viralstrang-DNA kobandiert, also ausschließlich Viralstränge in Gegenwart von Rifampicin synthetisiert worden waren.

Diese Rifampicin-Sensitivität der Komplementärstrangsynthese war bereits erwähnt worden (Brutlag, 1971), dennoch konnte bislang nicht ausgeschlossen werden, daß auch die Viralstrangsynthese über einen RNA-primer gestartet wird. Die auffällig verminderte Viralstrangsynthese in Gegenwart von RIF wurde nun von Ray mit der Annahme erklärt, daß für die Umwandlung von RFI → RF II durch Gen2 Protein eine Transkription der Origin Region erforderlich ist.

Diese Reaktion ist für die Initiation der Viralstrangsynthese notwendig. Bereits gebildeter RFII kann jedoch die Viralstrangsynthese starten, auch wenn RIF anwesend ist. RIF bewirkt daher nur eine verzögerte Hemmung, je nach Menge des vorhandenen RFII .
Diese Interpretation könnte auch die vorliegenden in vitro Daten (unter Verwendung endogener DNA) erklären. Ob sie tatsächlich stimmt, müssen zukünftige Versuche mit exogener RF I DNA zeigen.(s. Fukuda et al., 1976, Denhardt, 1975)

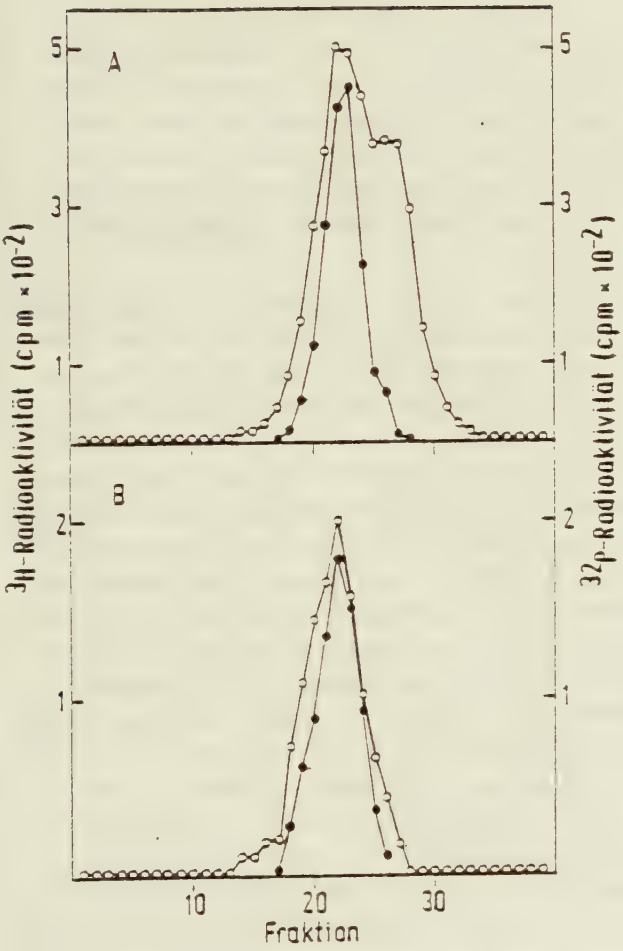


Abb.12: Gleichgewichtszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten:

Die Durchführung des Experiments erfolgte wie unter Abb. 11C beschrieben. Die Synthese erfolgte ohne (A) bzw. in Gegenwart von 50µl/ml Rifampicin (B). Die Dichte nimmt von rechts nach links zu.

(o——o) ^{3}H-dTMP-markierte, neusynthetisierte DNA

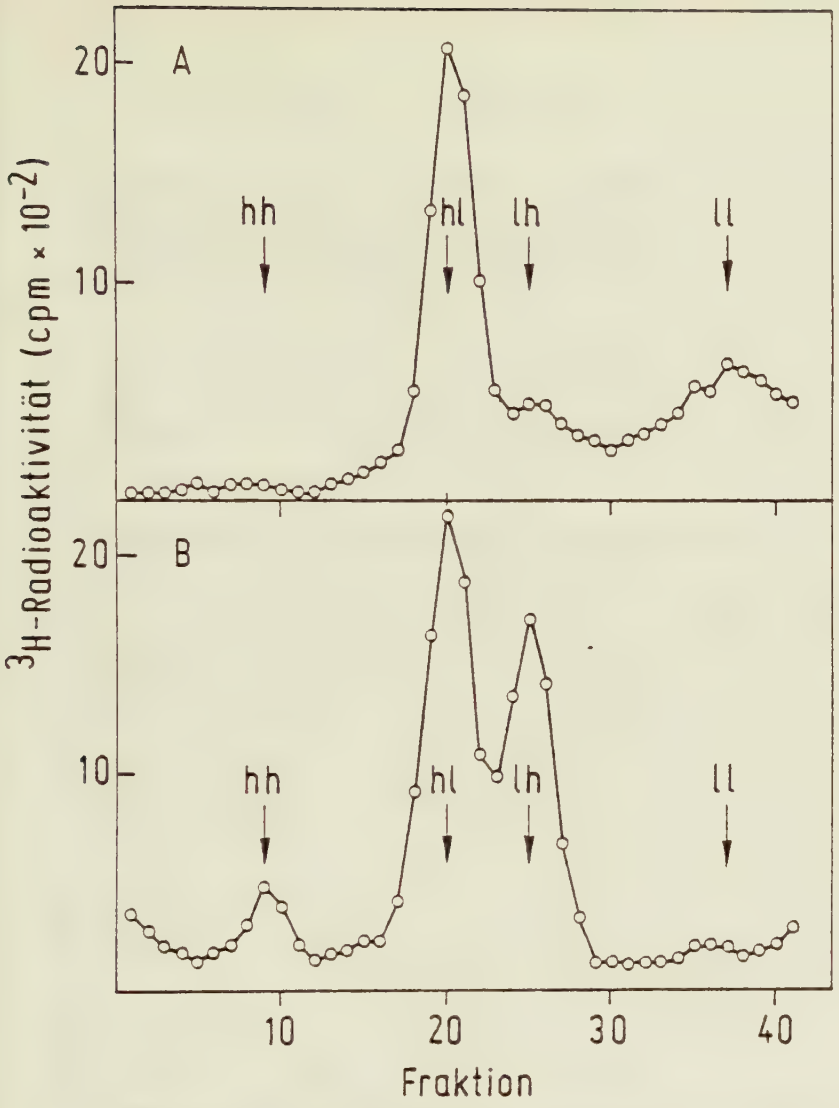
(•——•) ^{32}P-Viralstrang-DNA (Marker)

3.2.7. Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten nach Dichtemarkierung mit BrdUTP

Bereits im Kapitel 3.2.3. war gezeigt worden, daß es sich bei der durch Novobiocin stark hemmbaren Reaktion um eine "echte" DNA-Replikation gehandelt haben mußte. Eine Bestätigung dafür konnte jedoch nur ein Dichtemarkierungsexperiment geben. Einerseits konnte damit noch einmal demonstriert werden, daß beide Stränge markiert worden waren, also zwei Replikationsrunden durchlaufen worden waren und zum anderen mußte endgültig ausgeschlossen werden, daß unspezifische Reparatursynthesen die hohe Einbaurate hervorgerufen hatten.

Experimente von Kessler-Liebscher (Kessler-Liebscher et al., 1976) hatten gezeigt, daß nach Dichtemarkierung mit BrdUTP und Durchlaufen zweier Replikationsrunden eine Dichte der M13 RF-DNA von 1.81 g/ml erzielt wurde. Sind jeweils nur der Viralstrang oder der Komplementärstrang markiert, so resultieren Hybridmoleküle der Dichte 1.76 g/ml (Viralstrang schweremarkiert, Komplementärstrang leicht) bzw. 1.745 (Viralstrang leicht, Komplementärstrang BrdU-markiert).Hätte bei den beobachteten Einbauten eine Reparatursynthese stattgefunden, so wäre eine weit geringere Dichteverschiebung zu Tage getreten, da die Synthese dann nur über kurze Strecken verlaufen wäre. Im folgenden Experiment wurde dTTP im Energiemix durch BrdUTP (0.5 mM) ersetzt, zur radioaktiven Markierung der DNA wurde ^{3}H-dGTP verwendet. Die hohe BrdUTP Konzentration war notwendig, um die endogen vorhandenen Nukleotide (spez. dTTP) kompetitiv ausreichend verdrängen zu können und eine möglichst gute Dichteverschiebung zu erreichen.
Es wurden jeweils 10 Plättchen inkubiert (Standardbedingungen), die eine Hälfte diente als Kontrolle, die andere Hälfte wurde in Gegenwart von Rifampicin (50 µg/ml inkubiert. Die DNA wurde wie üblich isoliert (2.2.7.) und über einen neutralen CsCl-Gradienten ins Gleichgewicht zentrifugiert (2.2.4.).

Ein kleiner, jedoch signifikanter Teil der TCA-fällbaren radioaktiven Markierung bandierte bei einer Dichte von 1.81 g/ml. Es handelte sich hierbei um vollschwere DNA-Moleküle (hh), welche nach zwei Replikationsrunden gebildet worden waren (Abb. 13B). Der wesentliche Teil der Radioaktivität jedoch bandierte in zwei Gipfeln bei Hybriddichte von halbschwerer DNA (hl und lh). Die Zugabe von Rifampicin veränderte das Profil erheblich: Während vollschwere Moleküle überhaupt nicht mehr gefunden wurden (Abb.13A), war der Einbau im Bereich der leicht/schweren (lh) Hybrid-DNA (Komplementärstrang dichtemarkiert) erwartungsgemäß erheblich reduziert.



bb. 13: Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten dichtemarkierter Syntheseprodukte (BrdUMP-Markierung)

Jeweils 10 Plättchen wurden unter Standardbedingungen inkubiert, nur dTTP war durch BrdUTP (0.5 mM) ersetzt worden, als radioaktive Markierung diente ^{3}H-dGTP. Ein Teil diente als Kontrolle (B), ein Teil wurde in Gegenwart von 50 µl/ml Rifampicin für 30 min bei 30°C inkubiert.
Die Dichte (refraktometrisch bestimmt) nimmt von rechts nach links zu. Die Pfeile zeigen von rechts nach links die Dichtepositionen der hh, hl, lh und ll DNA an.
(o——o) ^{3}H-dGMP markierte, neusynthetisierte DNA

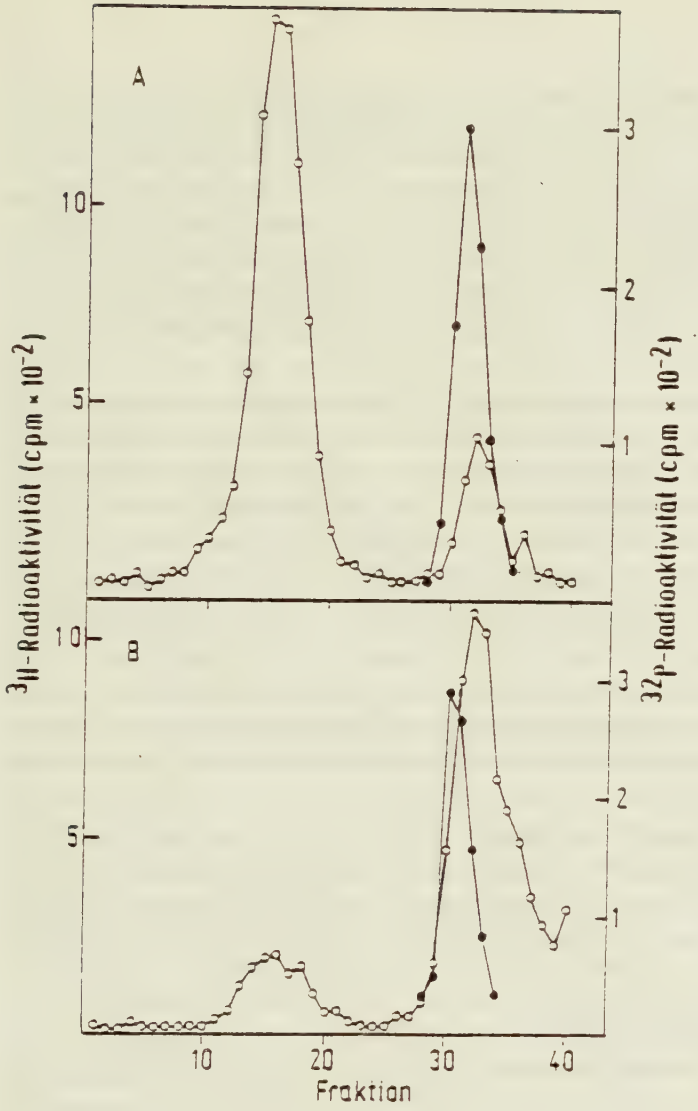
Zusätzlich wurde in Gegenwart von Rifampicin in der leicht/leicht Position von M13 RFI DNA (Staudenbauer, W.L. 1973a, 1.701 g/ml) ein weiterer Radioaktivitätsgipfel entdeckt. Diese Synthese war möglicherweise auf eine unspezifische, abortive DNA-Synthese in Gegenwart von Rifampicin zurückzuführen.

Nachdem nun eindeutig gezeigt war, daß das verwendete in vitro System zur Replikation doppelsträngiger M13 RFI DNA befähigt war, sollte noch geklärt werden, ob die DNA-Ligase an dieser Reaktion beteiligt gewesen war.

3.2.8. Der Effekt von Nikotinamidmononukleotid auf die Replikation

Wenngleich es nicht ihre ausschließlich Funktion darstellt (Staudenbauer, W.L. 1974;, Schneck, P.K., 1976), so dürfte das Auffüllen der durch den Abbau des RNA-primers entstandenen Lücke die wesentliche Rolle der DNA-Polymerase I bei der Replikation sein. Bei dieser Reaktion ist jedoch zur vollständigen Beendigung einer Replikationsrunde der Ringschluß durch die DNA-Ligase erforderlich, welche die letzte Phosphodiesterbindung knüpft. Dieses Enzym ist jedoch NAD-abhängig, ein Substrat, das die für die genannte Reaktion erforderliche Energie liefert (Staudenbauer, W.L., 1973a). Lipase + NAD $\longrightarrow$ Ligase-AMP + NMN.

Durch Weglassen von NAD und Inaktivierung der Ligase durch Zugabe von NMN sollte folglich kein Ringschluß mehr möglich sein und somit als Syntheseprodukt der überwiegende Anteil als RFII vorliegen.
Zwei Standardansätze mit jeweils 10 Plättchen wurden inkubiert, einer mit NAD, einer ohne NAD und einem Oberschuß von NMN, das die endogene Synthese von NAD blockieren sollte. Die Produktanalyse erfolgte durch eine Sedimentations-Zentrifugation in einem alkalischen CsCl-Gradienten. Während in der Kontrolle der weitaus größte Anteil als RFI sedimentierte (Abb. 14A), wurde in Gegenwart von NMN fast ausschließlich Form II DNA synthetisiert, welche nach Denaturierung in der Position linearer Einzelstrang-DNA auftaucht. Damit war gezeigt, daß der in vitro vollzogene Ringschluß den natürlichen Bedingungen entsprach.



). 14: Alkalische Sedimentationszentrifugation der Syntheseprodukte: Effekt von NAD und NMN

Je 10 Plättchen wurden unter Standardbedingungen inkubiert, ein Ansatz diente als Kontrolle (A), im anderen war NAD durch NMN ersetzt worden (B). Sedimentation von rechts nach links.

(o——o) ^{3}H-dTMP-markierte, neusynthetisierte DNA

(•——•) ^{32}P-SS-Marker DNA

3.2.9. Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.2.

Die Konzentrierung von Extrakten aus M13 am5 infizierten E.coli Zellen auf Membranfolien schuf die Voraussetzung zur in vitro Replikation der endogenen M13 RFDNA. Eine weitere Replikation dieser RF-Moleküle, also die Bildung einzelsträngiger Nachkommen DNA, unterblieb, da das hierfür (zusätzlich) erforderliche M13 Gen5 Produkt nach Infektion der Zellen mit der M13 am5 Mutante (am5 Mutation in Gen5) nicht synthetisiert worden war.

Die Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugationen in neutralen CsCl-EtBr-Gradienten sowie in neutralen CsCl-Gradienten nach Schweremarkierung der DNA mit BrdUTP zeigte, daß das System zur Durchführung vollständiger Replikationsrunden befähigt war. Das Auftauchen sogenannter vollschwerer (hh) DNA (beide Stränge mit BrdUTP schweremarkiert) bewies sogar, daß mindestens zwei Replikationsrunden durchlaufen worden waren und somit das in vitro System zur Initiation der DNA-Replikation in der Lage war.

Durch den Einsatz spezifischer Hemmer der DNA-Replikation, welcher zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Synthese führte, wurde zusätzlich bestätigt, daß es sich hierbei um eine echte DNA-Replikation und nicht um Reparatursynthesen gehandelt hatte.

Weitere Experimente hatten gezeigt, daß die enzymatischen Reaktionen abhängig von der Zugabe exogener Desoxyribonukleosidtriphosphate und Ribonukleosidtriphosphate waren und ferner durch Zugabe von ATP, Magnesiumchlorid, $NaCl_2$ und KCl drastisch stimuliert wurden.

3.3. Das lösliche System

3.3.1. DNA-Synthese in Extrakten aus uninfizierten sowie M13 am5 infizierten E.coli 159 Zellen

Die unter Punkt 3.2.9. zusammengefaßten Resultate des Abschnitts 3.2. lieferten die Grundlage für die weiteren Oberlegungen und ermutigten dazu, den in hoch konzentrierten Extrakten (d.h. hier vor allem bei hohen Konzentrationen der an der Replikation beteiligten Proteine) erzielten Einbau von dNTP in replizierende DNA auch in einem löslichen System zu reproduzieren.

Den beiden Arbeitsgruppen um Hurwitz und Kornberg war es bereits gelungen, exogen zugesetzte RFI DNA des Bakteriophagen ØX174 in einem Gemisch von Rohlysaten aus uninfizierten und ØX174-infizierten Zellen zu replizieren (Sumida-Yasumoto, C. et al., 1977, Marians, K.J. et al., 1977; Eisenberg, S. et al, 1976a; Scott, J.F. 1977;) Weder Extrakte aus uninfizierten Zellen, noch solche aus ØX-infizierten Zellen für sich allein konnten diesen Replikationsschritt durchführen.
Dies lag daran, daß einerseits unifizierte Zellen das einzige für die RF-Replikation notwendige phagenspezifische Protein, nämlich das Cistron A-Protein, nicht enthalten (Francke, B., et al., 1971 und Francke, B., et al., 1972), und andererseits ØX-infizierte Zellen die an der DNA-Replikation des Phagen beteiligten Wirtsproteine in nicht ausreichender Menge zur Verfügung stellen können, da die Synthese bakterieller Makromoleküle nach ØX-Infektion rasch abgeschaltet wird (Stone, A.B. 1970).

Etwas anders stellt sich die Situation bei der RF-Replikation von M13 dar. Zwar wird hierfür auch nur ein einziges phagenspezifisches Protein, das Gen 2-Protein, benötigt, die Synthese bakterieller Makromoleküle läuft jedoch mit eingeschränkter Rate weiter (Hofschneider, P.H. et al., 1963 und Ray, D.S. et al. 1966). Aus diesem Grund konnte man davon ausgehen, daß Extrakte aus M13-infizierten Zellen im Gegensatz zu solchen aus ØX-infizierten Zellen zur RF-Replikation in der Lage sind, ohne daß eine Zugabe anderer Extrakte oder Proteinfraktionen notwendig wäre.
Für derartige Untersuchungen der DNA-Replikationsprozesse, speziell für die Aufgliederung in Einzelschritte, erweisen sich die bekannten Replikationshemmer als äußerst nützlich (Cozzarelli, N.R. 1977).
Hierzu gehören, wie unter anderem von Staudenbauer gezeigt werden konnte, Novobiocin und Oxolinsäure. So wird beispielsweise die DNA-Replikation in nukleotidpermeablen Zellen bereits durch 2 µg/ml Novobiocin zu über 80% (Staudenbauer, W.L., 1975), durch 5 µg/ml Oxolinsäure zu 75 % gehemmt (Staudenbauer, W.L., 1976).
Auch Nalidixinsäure, wie Oxolinsäure ein Quinolonderivat, muß an dieser Stelle erwähnt werden. Es hemmt spezifisch nur solche Replikationsschritte, welche an einer doppelsträngigen DNA-Matritze ablaufen, wie die Transferreplikation in der Spenderzelle (Barbour, S.D., 1967) oder die M13 Doppelstrangreplikation bzw. Einzelstrangsynthese (Schneck, P.K.et al.1973).
Hingegen werden Replikationsschritte an einer einzelsträngigen Matritze

(Umwandlung von M13 Einzelstrang-DNA in die doppelsträngige Form, Transferreplikation in der Empfängerzelle) nicht gehemmt.

Als letztes sei Rifampicin, ein spezifischer Hemmer der RNA-Polymerase, genannt (Wehrli, 1971). Es blockiert die Synthese eines RNA-primers und damit den Kettenstart durch eine DNA-Polymerase (Brutlag, D. et al., 1971).
Handelt es sich bei in vitro beobachteten Einbauten also um eine "echte" DNA-Replikation, dann sollte man durch NOV und OXO eine vollständige Hemmung erwarten können (siehe auch 3.1.2.). Da Rifampicin während der RF-Replikation von M13 präferentiell und vollständig die Komplementärstrangsynthese hemmt (Kesseler-Liebscher, B.E., et al., 1976), sollte es in entsprechenden in vitro-Experimenten den Einbau zumindest auf 50 % des Kontrollwerts reduzieren.

Extrakte aus uninfizierten (E_0) und M13 am5-infizierten (E_i) E.coli 159 Zellen wurden nach der üblichen Methode (2.2.7.) hergestellt, 100 µl Ansätze dann ohne oder mit zugesetztem M13 RFI (2 µg) bei 30°C inkubiert und 20 µl Proben daraus zu den jeweils angegebenen Zeiten TCA-gefällt. Wie auf Abb. 15 C zu sehen ist, erfolgt in Extrakten aus uninfizierten Zellen mit und ohne exogen zugesetzter RFI DNA erwartungsgemäß kein Einbau von ^{3}H-Radioaktivität in TCA-fällbares Material, da ihnen das für die M13 RF-Replikation notwendige Gen 2-Protein fehlt. In Extrakten aus infizierten Zellen allein (Abb. 15A) und in einer Kombination von E_i und E_0 (Abb. 15 B) ist hingegen ein geringer Einbau von ^{3}H-dTMP zu beobachten.

HEMMER	^{3}H-EINBAU (CPM)	EINBAU (%)
-	2630	100
RIF (50 µg/ml)	2070	79
OXO (100 µg/ml)	1025	39
NOV (50 µg/ml)	1423	54

Tabelle 4:

Standardansätze (siehe Abb 15) wurden ohne, bzw. mit Hemmer (5 µl) für 30 min bei 30°C inkubiert und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

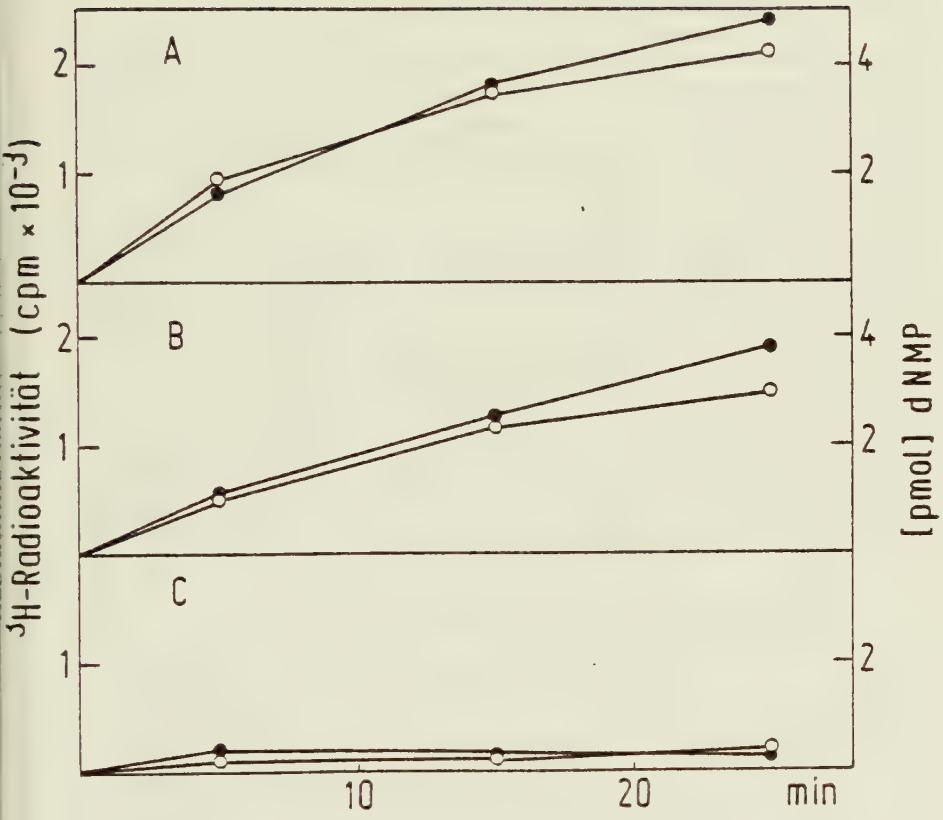


Abb.15: Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP in Extrakten aus uninfizierten bzw. M13 am5 infizierten E.coli 159 Zellen:

Jeweils 80 µl Extrakt aus uninfizierten bzw. M13 am5 infizierten E.coli 159 Zellen und 20 µl Energiemix (2.2.8.) wurden ohne (o——o) bzw. mit zugesetztem M13 RFI (2µl = 2 µg) (•——•) bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 20 µl Proben entnommen und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt

Abb.15 A: Extrakt aus infizierten Zellen

Abb.15 B: Extrakt aus infizierten und uninfizierten Zellen (1 : 1)

Abb.15 C: Extrakt aus uninfizierten Zellen

Da keine Stimulierung des Einbaus durch Zugabe von RFI erzielt wurde, mußte man davon ausgehen, daß die vorhandene Konzentration an endogener M13 DNA bereits im Sättigungsbereich des Systems lag.

Anschließend wurden vier Standardansätze ohne und in Gegenwart der oben erwähnten Hemmer inkubiert. Aber selbst sehr hohe Konzentrationen von OXO (100 µg/ml) und NOV (50 µg/ml) bewirkten keine drastische Hemmung der Einbauten. Auch Rifampicin hatte nur einen schwachen Hemmeffekt, wie auf Tabelle 4 zu sehen ist.
Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß es sich bei den gemessenen Einbauten nicht um eine "echte" RF-Replikation, sondern entweder um Reparatursynthesen oder sog. "nicktranslation" (d.h.: an einem Einzelstrangbruch in der Doppelhelix wird durch Polymerase I ein Strang von 5' nach 3' abgebaut und gleichzeitig, durch Verlängerung des freien 3'OH Endes an der Bruchstelle, wieder neusynthetisiert) an der endogenen M13 DNA handelte.
Was aber konnte der Grund dafür sein? Der aus infizierten Zellen hergestellte Extrakt (E_1) enthielt wohl alle notwendigen Proteine, aber möglicherweise - und das ist sicher wie erwähnt eines der entscheidenden Kriterien - in nicht ausreichender Konzentration.

3.3.2. Einbaukinetik in Gegenwart des E.coli HD-Proteins

Einer dieser entscheidenden Faktoren hätte das E.coli HD-Protein (Sigal, N. 1972, Alberts, B., 1977) sein können, da es,wie bereits erwähnt, zu einem großen Teil bei der Aufbereitung des Extrakts mit dem Wirtschromosom, an das es stark bindet, abzentrifugiert wird. Aus diesem Grunde wurden Standardansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteins bei 30°C für 30 min inkubiert und und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt. Wie aus der Abbildung 16 zu ersehen ist, führte die Zugabe des E.coli HD-Proteins zu Extrakten aus M13 am5 infizierten E.coli Zellen zu einer drastischen Stimulierung der endogenen DNA-Synthese. Als optimale Konzentration des exogen zugegebenen E.coli HD-Proteins erwiesen sich 40 bis 60 µg/ml. Die optimale Konzentration schwankte von Extraktzubereitung zu Extraktzubereitung und dürfte den unterschiedlichen Gehalt endogen vorhandenen E.coli HD-Proteins im Extrakt wiederspiegeln. Die Zugabe von sehr hohen Konzentrationen des Proteins von über 100 µg/ml führte zu einer Inhibierung der beobachteten DNA-Synthese.

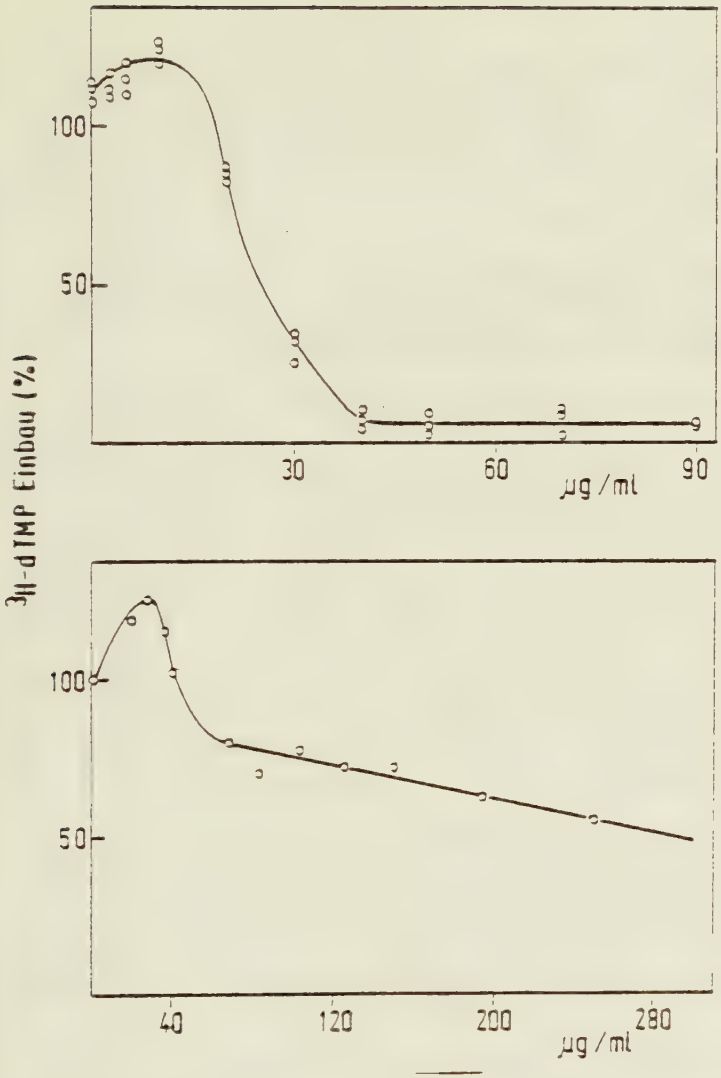
Abb.16: Effekt des E.coli HD-Proteins auf die in vitro DNA Synthese:

Standarzdansätze (2.2.8.3.) wurden bei 30°C für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von E.coli HD-Protein inkubiert und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

Dieses positive Versuchsergebnis führte zu der Oberlegung, ein weiteres Helix stabilisierendes Protein, nämlich das M13 Gen 5-Protein, zu verwenden und dessen Effekt auf die im flüssigen System beobachtete Synthese zu untersuchen.

3.3.3. Effekte des M13 Gen 5-Proteins

Für diese Zwecke war es zunächst notwendig, die Aktivität des M13 Gen 5-Proteins in einem geeigneten Kontrollexperiment (d.h. in einem bekannten in vitro System) eindeutig nachzuweisen. Hierfür bot sich natürlich die Umwandlung einzelsträngiger DNA von M13 in die doppelsträngige Form in Extrakten aus uninfizierten E.coli Zellen an.
Es wurden 80 µl Extrakt aus uninfizierten Zellen und 4 µl SS-DNA (54 µg/ml ohne oder mit 5 µl Gen 5-Protein (Endkonzentration siehe Abb. 17 A) vermischt und unter Standardbedingungen inkubiert. Pro Meßpunkt wurden drei Werte bestimmt. Während bei Konzentrationen von 2,5 µg bis ca. 20 µg/ml Extrakt eine leichte Stimulierung der Synthese zu beobachten war, trat bei höheren Konzentrationen die erwartete vollständige Hemmung der Synthese ein (bei ca. 40 µg/ml Extrakt). Der Versuch zeigte, daß das M13 Gen 5-Protein neben der Hemmung der Komplementärstrangsynthese einen zusätzlichen stimulierenden Effekt auf die DNA Synthese des Phagen besaß, was bereits aus in vivo Experimenten von Staudenbauer (Staudenbauer, W.L. (1973) und Grandis (Grandis, A.S. et al., 1973) geschlossen worden war. Da nun gezeigt war, daß das verwendete Gen 5-Protein aktiv war, konnte nun sein Effekt in Extrakten aus M13 am5-infizierten Zellen untersucht werden. Dazu wurden Standardansätze mit entsprechenden Extrakten mit verschiedenen Konzentrationen des Proteins inkubiert und die TCA-fällbare Radioaktivität nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 30°C bestimmt.
Auf Abbildung 17 B ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt. Bei steigenden Konzentrationen des Proteins wurde die Synthese stimuliert, bis bei einer Konzentration von 40 µg/ml ein Maximum erreicht war. Diese Stimulierung dürfte der, auch bei der SS zu RF-Umwandlung beobachteten, Steigerung der Syntheserate entsprochen haben. Die Gründe, für die bei höheren Konzentrationen beobachtete Reduzierung des Einbaus, hätte einmal auf die Hemmung der Komplementärstrangsynthese zurückgeführt werden können und zum anderen auf das Aufschmelzen sogenannter "Hairpin" -bereiche im Viralstrang, welche als Promotoren der RNA-primer (ori-RNA)-Synthese dienen (Geider, K., 1974; Geider, K., 1978).



T.17: Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP in Gegenwart von M13 Gen 5-Protein

80 µl Extrakt aus uninfizierten Zellen, 4 µl M13 SS-DNA (54 µg/ml) und 5 µl Gen 5-Protein (0 - 450 µg/ml) wurden gemischt und bei 30°C für 30 min inkubiert. 20 µl Proben wurden entnommen und die TCA-fällbare Radioaktivität (3-fach) bestimmt (A).

Je 20 µl Extrakt aus M13 am5 infizierten Zellen und 5 µl Gen 5-Protein (0 - 1.4 mg/ml) wurden vermischt, unter Standardbedingungen inkubiert und wie üblich die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt (B).

Auch bei sehr hohen Konzentrationen von Gen 5-Protein fiel jedoch der Einbau von ^{3}H-dTMP nicht unter 50 % des Kontrollwerts ab. Das deutete darauf hin, daß es sich tatsächlich um eine selektive Hemmung der Komplementärstrangsynthese handelte, während keinerlei Effekt auf die Viralstrangsynthese zu verzeichnen war.

3.3.4. Konzentrationsabhängigkeit der Effekte des Gen 5- und E.coli HD-Proteins sowie Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP in Gegenwart von E.coli HD-Protein und M13 Gen 5-Protein

Zur weiteren Bestätigung der oben genannten Ergebnisse wurden die Effekte von M13 Gen 5-Protein und E.coli HD-Protein miteinander direkt verglichen. Dazu wurden Standardansätze bei 30°C für 30 min in Gegenwart der jeweils angegebenen Konzentrationen von HD-Protein bzw. Gen 5-Protein (Abb. 18) inkubiert. Auf dieser Darstellung sind gut die unterschiedlichen Effekte der beiden Proteine zu erkennen. Während bei Konzentrationen zwischen 50 und 80 µg/ml E.coli HD-Protein eine maximale Stimulierung der Synthese zu beobachten ist, fällt bei gleichen Konzentrationen von Gen 5-Protein die Synthese auf ca. 50 % der unbehandelten Kontrolle ab. Allerdings ist wie bereits im zuvor beschriebenen Versuch eine leichte Stimulierung der DNA-Synthese durch geringe Konzentrationen des Gen 5-Proteins (Maximum bei ca. 25 µg/ml) zu beobachten.

Abb. 18B zeigt das Ergebnis einer Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP in Gegenwart von M13 Gen 5-Protein bzw. E.coli HD-Protein. Dazu waren drei Parallelansätze unter Standardbedingungen ohne bzw. in Gegenwart von Gen 5-Protein (40 µg/ml) oder HD-Protein (40 µg/ml) inkubiert worden. Die hier verwendeten Konzentrationen der beiden Proteine bestätigten erneut die vorherigen Ergebnisse.

Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, daß bei gleichen Konzentrationen (40 µg/ml) von exogen zugegebenen Proteinen in einem Fall durch HD-Protein gegenüber Gen 5-Protein eine ca. 2,5-fach stärkere Stimulierung (Abb. 18A), im anderen Fall nur eine ca. 1,5-fach (Abb. 18B) stärkere Stimulierung erzielt wurde. Da für die beiden Versuche zwei verschiedene Extraktaufarbeitungen verwendet wurden, wird einmal mehr deutlich, wie entscheidend die endogen vorhandene Menge an E.coli HD-Protein auf die meßbare Stimulierung wirkt.

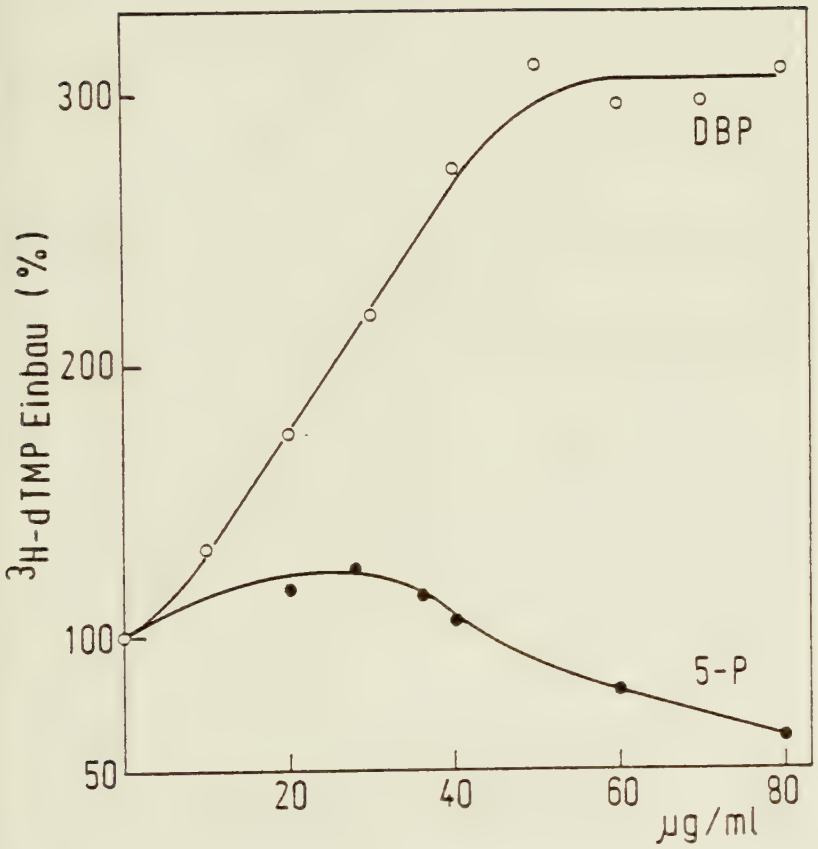
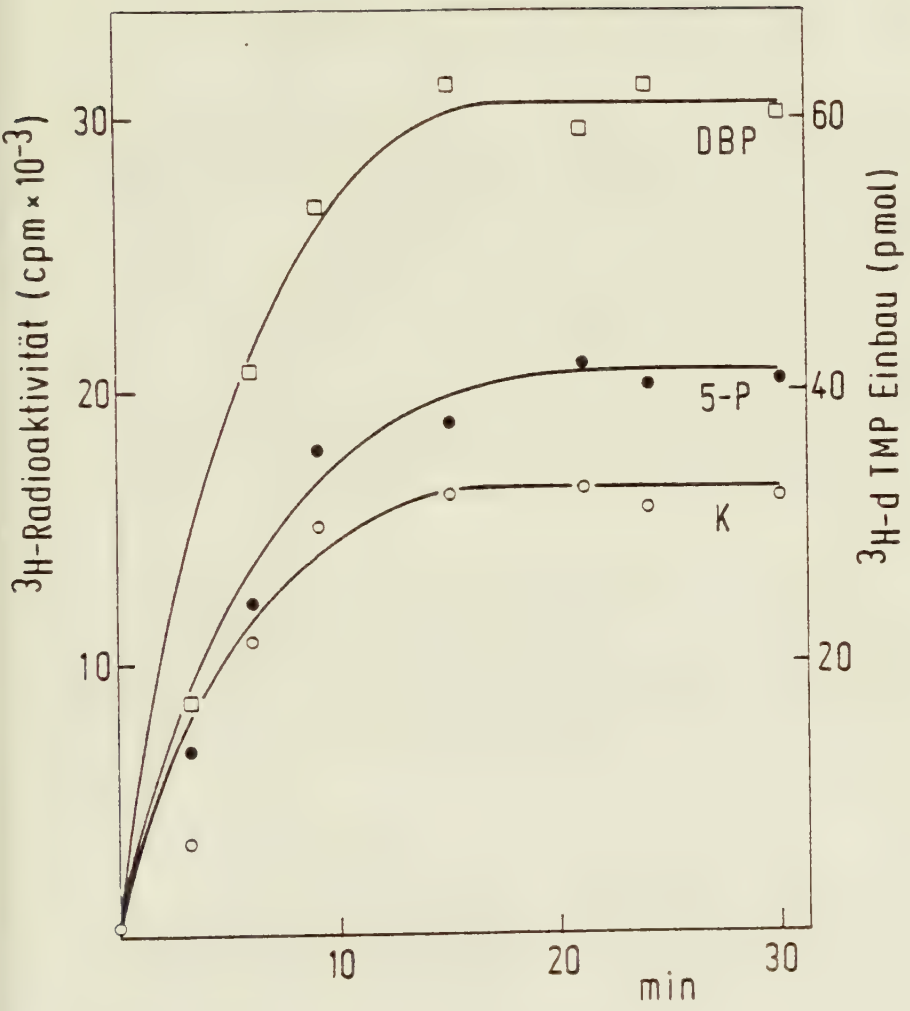


Fig.18A: Vergleich der Effekte von M13 Gen 5-Protein und E.coli HD-Protein

Standardansätze (Extrakte aus infizierten Zellen) wurden bei 30°C für 30 min in Gegenwart der jeweils angegebenen Konzentrationen von HD-Protein bzw. Gen 5-Protein inkubiert. o—o HD-Protein; •—• Gen 5-Protein.



b.18B: Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP in Gegenwart von M13 Gen 5-Protein bzw. E.coli HD-Protein.

3 Parallelansätze wurden unter Standardbedingungen ohne bzw. in Gegenwart von Gen 5-Protein (40µg/ml) oder HD-Protein (40 µg/ml) inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Reaktionen gestoppt und die TCA-fällbare Radioaktivität gemessen.

(o——o) Kontrolle; (•——•) + Gen 5-Protein; (□——□) + HD-Protein;

3.3.5. Effekte verschiedener Hemmer auf die in Gegenwart von Gen 5-Protein ablaufende Synthese

Um die in Gegenwart von Gen 5-Protein ablaufende Synthese noch näher charakterisieren zu können, wurden weitere identischen Ansätze (2.2.8.3.) bei 30°C für 30 min inkubiert. Ein Ansatz diente als Kontrolle,zu den anderen wurden die auf der nachfolgend aufgeführten Tabelle angegebenen Hemmer in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben.

In Gegenwart von NAL und NOV (Sugino, A. 1977; Gellert, M., 1977) und OXO trat die erwartete Hemmung der Synthese ein, dagegen beeinflußte Rifampicin (5 µg/ml) die Synthese praktisch nicht. Gelegentlich war bei höheren Rifampicin-Konzentrationen der Einbau bis zu 42 % reduziert: Hierbei dürfte es sich jedoch um Sekundäreffekte gehandelt haben. Aus den bisherigen in vivo Resultaten wurde eine Beteiligung der Rifampicin-sensitiven RNA-Polymerase bei der SS-Synthese ausgeschlossen (Fidanian, H.M. et al., 1974).

Um so unerwarteter war die Hemmung der Reaktionen durch STL, ebenfalls ein spezifischer Hemmer der RNA-Polymerase. Eine mögliche Interpretation hierfür ist die auf Seite 50 gegebene Erläuterung des RIF-Effekts auf die Transkription der "origin"-DNA als Voraussetzung für die Umwandlung von RF I nach RF II bzw. die Viralstrangsynthese. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß in Gegenwart von RIF eine Elongation möglich ist, während STL diesen Schritt hemmt.

3.3.6. Produktanalyse durch Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten

Wesentliche Aufschlüsse darüber, ob es sich bei der beobachteten Synthese um eine semikonservative Replikation gehandelt hatte, konnte nur durch eine nachfolgende Gleichgewichtszentrifugation der in Gegenwart von HD-Protein synthetisierten BrdUTP dichtemarkierten Produkte erfolgen. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Standardansätzen (25-µl Ansätze mit 25 µg/ml E.coli HD-Protein) dDTP durch BrdUTP (250 µM) ersetzt (radioaktive Markierung mit ^{3}H-dGTP), nach 30 min bei 30°C die Reaktion gestoppt und die Produkte in einem neutralen CsCl-Gradienten ins Gleichgewicht zentrifugiert. Wie aus der Abb. 19 A zu ersehen ist, erschienen drei Radioaktivitätsgipfel, die, von rechts nach links, den Dichten 1,745; 1,76

HEMMER	^{3}H-dTMP EINBAU (%)
-	100
+RIF (5 µg/ml)	97
+RIF (50 µg/ml)	58 (99)
+COU (10 µg/ml)	13
+NOV (10 µg/ml)	25
+OXO (50 µg/ml)	11
+OXO (100 µg/ml)	11
+NAL (50 µg/ml)	27
+NAL (100 µg/ml)	15
+STL (50 µg/ml)	39

Tabelle 6:

Effekte verschiedener Hemmer auf die im flüssigen System, in Gegenwart von Gen 5-Protein ablaufende DNA-Synthese

Standardansätze (2.2.8.3.) von 44 µl wurden 30 min bei 30°C in Gegenwart der angegebenen Hemmer inkubiert und die TCA-fällbare Radioaktivität (von jeweils zwei Parallelansätzen der Mittelwert) bestimmt.

und 1,81 g/cm³ und somit DNA von Hybriddichte (im Viralstrang oder Komplementärstrang markiert) oder vollschwerer DNA entsprachen.
Ferner ist zu erkennen, daß die, als endogener Marker zusätzlich beigegebene ^{32}P-RFI-DNA, zu über 55 % bei Hybriddichte bandierte. Dies bedeutete, daß innerhalb der 30-minütigen Inkubationszeit über die Hälfte aller Moleküle repliziert worden war. Ein Teil der Moleküle hatte eine zweite Replikationsrunde durchlaufen.
Wie bereits in Cellophanfoliensystem beobachtet, hemmte Rifampicin (10 µg/ml) die Komplementärstrangsynthese vollständig (Abb.19 B). Wurde das E.coli HD-Protein weggelassen (Abb. 19 C) erfolgte praktisch keine Replikation der endogenen DNA (unter 10 % der Kontrolle).

3.3.7. Analyse der in Gegenwart von E.coli HD-Protein bzw. M13 Gen 5-Protein synthetisierten Produkte durch Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-Gradienten

Obleich die Bruttoeinbauten durch beide Proteine konzentrationsabhängig stimuliert werden konnten, so mußten dennoch bei der Produktanalyse die signifikanten Unterschiede auftreten, die bereits bei den vorangegangenen Experimenten zu sehen waren. Unter Verwendung gleicher Konzentrationen (60 µg/ml) von Gen 5-Protein und HD-Protein wurden zwei Standardansätze 30 min bei 30°C inkubiert und die Produkte, wie unter Abb. 19 beschrieben analysiert .

Erneut (Siehe auch Abb. 66) war eine selektive Hemmung der Komplementärstrangsynthese durch Gen 5-Protein zu verzeichnen, während das E.coli HD-Protein die Synthese beider Hybridmoleküle stimulierte (Abb.20).

3.3.8. Kombinierte Zugabe von M 13 Gen 5-Protein und E.coli HD-Protein zu Extrakten aus M13 am5 infizierten Zellen

Ein Vergleich der Effekte des M13 Gen 5-Protein mit dem E.coli HD-Protein hatte gezeigt, daß die Zugabe von Gen 5-Protein in Konzentrationen von 10 bis 40 µg/ml den Einbau von dTMP in TCA-fällbares Material zu einem geringeren Prozentsatz stimulierte als die Zugabe von E.coli HD-Protein. Ferner hat es sich herausgestellt, daß die Zugabe von 16 µg/ml E.coli HD-Protein eine optimale Stimulierung der Synthese bewirkte. Es war folglich

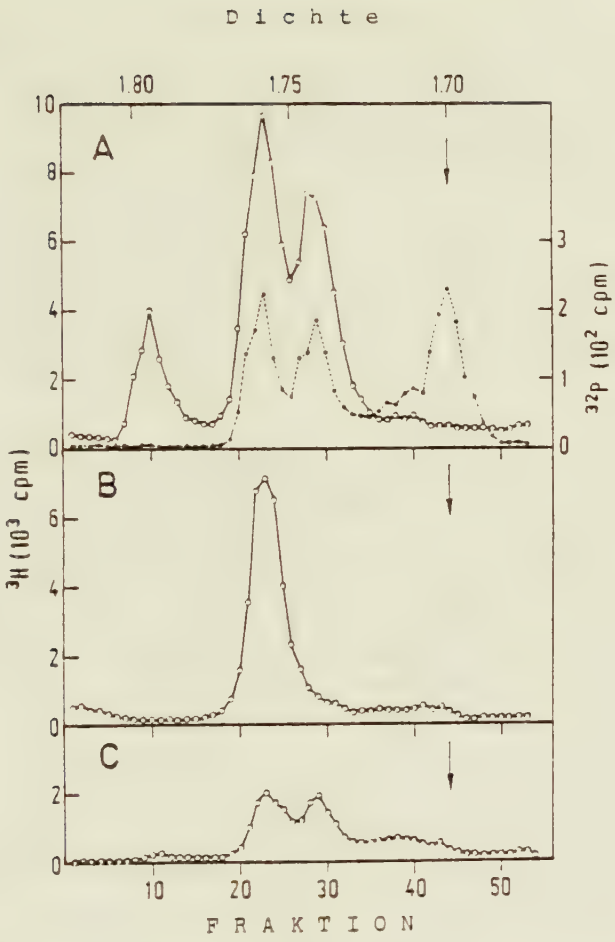


Abb.19: Gleichgewichtszentrifugation der in Gegenwart von E.coli HD-Protein synthetisierten, BrdUTP-dichtemarkierten Produkte:

Zu Standardansätzen von 25 µl (dTTP ersetzt durch BrdUTP 250 µM, radioaktive Markierung mit ^{3}H-dGTP) wurde entweder exogene ^{32}P-markierte M13 RFI DNA + HD-Protein (25 µg/ml) (A) oder HD-Protein (25µg/ml) + Rifampicin (10 µg/ml) gegeben; ein Ansatz diente als Kontrolle (C). Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 30 min. 5.4 gr CsCl + 4 gr Probe + TEN wurden 40 Stunden bei 36000 upm zentrifugiert (o——o) ^{3}H-markierte DNA, (•——•) ^{32}P-markierte DNA.
Der Pfeil zeigt die Position von DNA parentaler Dichte.

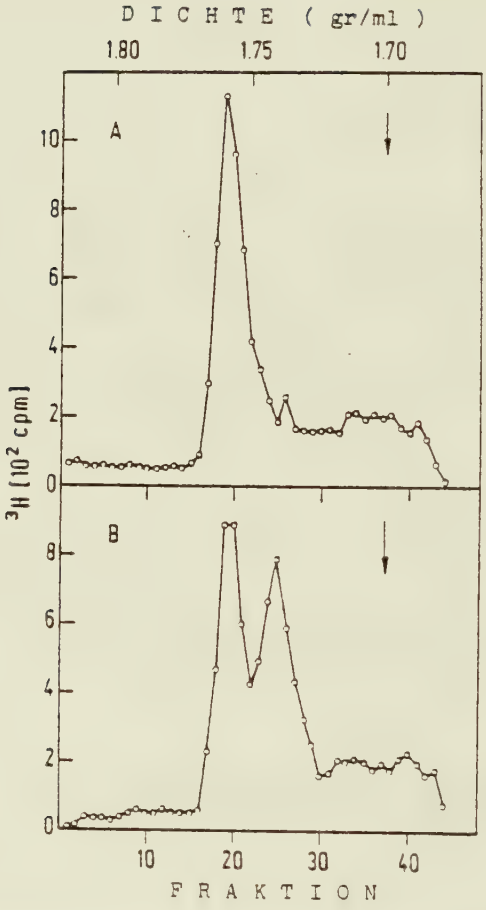


Abb.20: Gleichgewichtszentrifugation der in Gegenwart von Gen 5-Protein bzw. HD-Protein synthetisierten Produkte.

Standardansätze von 25 µl wurden bei 30°C für 30 min inkubiert, wobei entweder 60 µg/ml Gen 5 Protein (A) oder 60 µg/ml HD-Protein (B) zugegeben wurden.
Die Zentrifugation erfolgte wie unter Abb. 22 beschrieben. Der Pfeil gibt die Position der DNA parentaler Dichte an.

interessant zu untersuchen, ob die in Gegenwart von Gen 5-Protein stimulierte Synthese durch eine Zugabe geringer Mengen E.coli HD-Protein weiter gesteigert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden 25 µl-Ansätze für 30 min in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von E.coli HD-Protein (Abb.21 A) und M13 Gen 5-Protein (Abb.21 B) sowie M13 Gen 5-Protein + 24 µg/ml E.coli HD-Protein inkubiert.

Der durch die Zugabe von Gen 5-Protein stimulierte Einbau konnte also tatsächlich durch die Anwesenheit einer optimalen Konzentration von E.coli HD-Protein weiter stimuliert werden. Die additiven Effekte der beiden Proteine führten zur Oberlegung, die Einzelstrangsynthese von M13 in diesem System zu untersuchen.

3.3.9. Einzelstrangsynthese im löslichen System

Die beobachtete Blockierung der Komplimentärstrangsynthese durch größere Konzentrationen des Gen 5-Proteins sollte durch eine Produktion freier Viralstränge begleitet sein. Eine derartige Situation wäre mit der in vivo beobachteten Umschaltung von Doppelstrangreplikation auf Einzelstransynthese bei einer entsprechenden Anhäufung von Gen 5-Protein in der späten Infektionsphase vergleichbar gewesen. Um derartige freie einzelsträngige DNA, die nach einer zweiten Replikationsrunde hätten freigesetzt werden müssen, zu entdecken, wurde die Inkubationszeit auf 2 Stunden ausgedehnt und die Reaktion in Gegenwart einer optimalen Konzentration von E.coli HD-Protein und einer genügenden Menge von Gen 5-Protein (60 µg/ml) zur vollständigen Blockierung der Komplimentärstrangsynthese durchgeführt.

Wenn die Produkte anschließend durch Sedimentationszentrifugation über einen neutralen Rohrzuckergradienten (5-25 %, w/v, in TEN) analysiert wurden, so stellte man fest, daß ein beträchtlicher Teil der Markierung mit der als Marker eingesetzten M13 ^{32}P-SS-DNA kobandierte (siehe Abb.22 A). Wurde im Kontrollexperiment anstelle des Gen 5-Proteins das E.coli HD-Protein eingesetzt (wobei die Gesamtmenge der "helix destabilising proteins" dieselbe blieb), wurden keine Einzelstränge gefunden und die Markierung fand sich ausschließlich in der Position von RF I und RF II DNA (Abb. 22 B).

Zur weiteren Produktanalyse wurde das in Gegenwart von Gen 5-Protein synthetisierte Material in einem neutralen CsCl-Gradienten ins Gleichgewicht zentrifugiert, um eine Auftrennung von einzel- und doppelsträngiger-DNA zu erzielen.

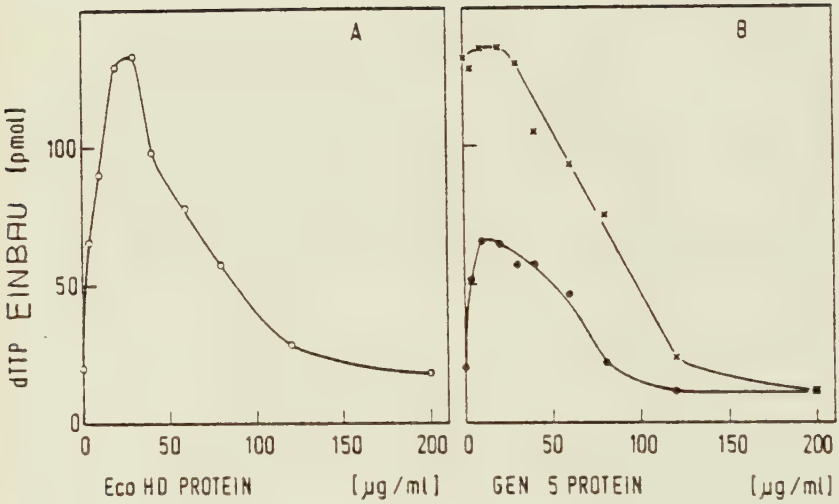


Abb. 21: Kinetik des Einbaus von ^{3}H-dTMP und die Effekte des Gen 5 Proteins und HD-Proteins im flüssigen System:

25 µl Standardansätze wurden in Gegenwart von Gen 5-Protein bzw. HD-Protein 30 min bei 30°C inkubiert und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

(A) + HD-Protein; (B) (●——●) + Gen 5-Protein;

(+——+) + Gen 5-Protein + HD-Protein (25 µg/ml

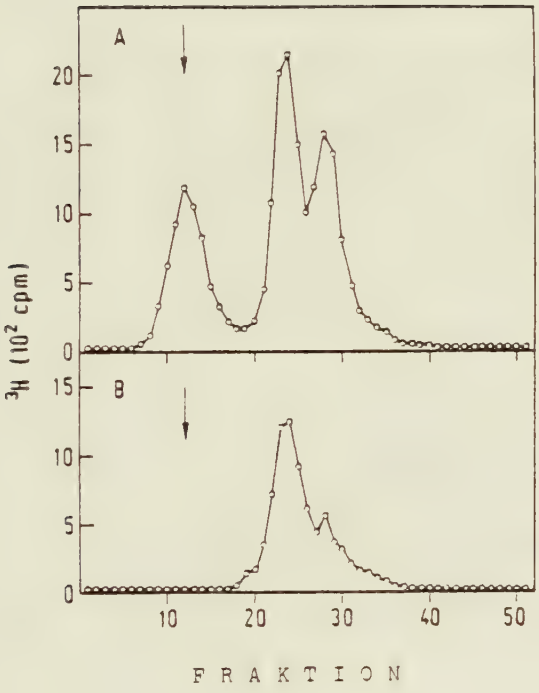


Abb. 22: Sedimentationszentrifugation in einem neutralen Rohrzuckergradienten:

Zwei Standardansätze wurden in Gegenwart von Gen 5-Protein + HD-Protein (A) bzw. HD-Protein allein (B) bei 30°C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde auf 2 Studnen verlängert. Die Produkte wurden auf einen neutralen Rohrzucker-Gradienten (5 % - 25 % Rohrzucker in TEN) geschichtet und 3.5 Stunden bei 45.000 upm in einem SW 60 Rotor (Beckman) zentrifugiert. Die Sedimentation erfolgte von rechts nach links. Der Pfeil gibt die Position von M13 SS-DNA an.

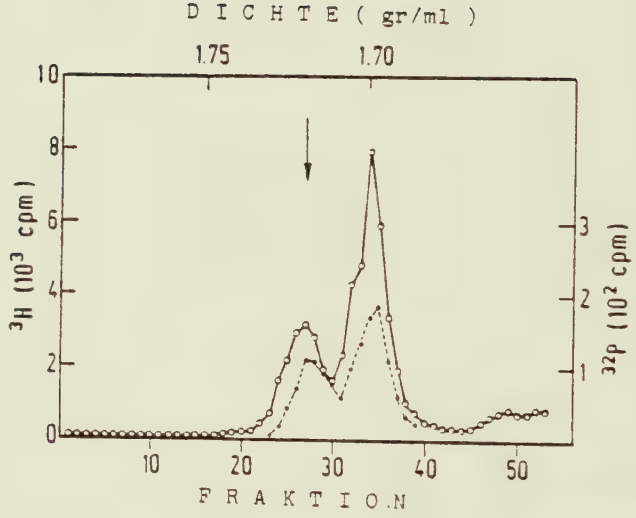


Abb.23: Einzelstrangsynthese im flüssigen System:

Der Standardsatz (25 µl) wurde in Gegenwart von 60 µg/ml Gen 5-Protein und 25 µl/ml HD-Protein sowie ^{32}P-markierter M13 RFI DNA bei 30°C für 30 min inkubiert. Die Produkte wurden, wie unter Abb. 22 beschrieben, analysiert. Der Pfeil gibt die Position einzelsträngiger M13 DNA an.

(o—o) ^{3}H-markierte DNA, (•—•) ^{32}P-prämarkierte DNA

Es zeigte sich (siehe Abb. 23), daß ca. 30 % der eingebauten Markierung mit der M13 ^{32}P-SS-Einzelstrang-DNA kobandierte. Bemerkenswert war, daß über 40 % der ^{32}P-Markierung der exogen zugegebenen RF-DNA in der Einzelstrangposition wiedergefunden wurde. Dies legte den Schluß nahe, daß nahezu alle M13 Doppelstrangmoleküle wenigstens eine Replikationsrunde der Einzelstrangsynthese durchlaufen hatten.

3.3.10. Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt 3.3.

Die mit dem Membranfoliensystem gewonnenen Ergebnisse bestätigten die ursprüngliche Annahme, daß ausschließlich das Ausverdünnen essentieler Replikationsproteine frühere Versuche einer in vitro Replikation bzw. Einzelstrangsynthese im löslichen System zum Scheitern gebracht hat.

Tatsächlich zeigte sich, daß nach Zugabe von E.coli HD-Protein zu Extrakten aus M13 am5 infizierten E.coli Zellen doppelsträngige M13 DNA mehrere Replikationsrunden durchlaufen konnten. Ebenso bewirkte die Zugabe niederer Konzentrationen von M13 Gen 5-Protein (bis zu 30µg/ml) eine Stimulierung der Replikation doppelsträngiger M13 DNA. Dagegen bewirkten höhere Konzentrationen von Gen 5-Proteinen (aber nicht von E.coli Protein) eine präferenzielle Inhibierung der Komplimentärstransynthese, die vorallem nach Zugabe optimaler Konzentrationen von E.coli HD-Protein ein Umschalten von Doppelstrangreplikation auf eine Einzelstrangsynthese bewirkten. Somit konnte in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration der beiden Helix-stabilisierenden Proteine sowohl die M13 DNA-Replikation als auch die M13 Einzelstransynthese im zellfreien System getrennt voneinander untersucht werden.

4. Diskussion

Der Replikationszyklus des Bakteriophagen M13 läßt sich in drei Schritte gliedern, welche zeitlich nacheinander ablaufen. Zunächst erfolgt die Umwandlung der infizierenden Viralstrang-DNA (SS) in die doppelsträngige replikative Form (RFI bzw. RFII). Dann werden diese Moleküle mehrfach repliziert und abschließend die einzelsträngige Nachkommen-DNA synthetisiert, wobei die RF-Moleküle als Matritzen dienen. Während am ersten Schritt ausschließlich Wirtsenzyme beteiligt sind, werden für die beiden nachfolgenden Schritte zusätzlich phagenspezifische Genprodukte benötigt. Bei der RF-Replikation ist dies das M13 Gen 2 Protein, bei der Einzelstrangsynthese die M13 Gen 2-und Gen 5-Proteine. Die drei Replikationsschritte scheinen aufgrund neuerer Untersuchungen nach nur zwei unterschiedlichen Mechanismen abzulaufen: einem Mechanismus für die Umwandlung viraler SS-DNA in die doppelsträngige Form durch Komplementärstrangsynthese und einem zweiten Mechanismus zur Synthese viraler SS-DNA.

Eine Reihe von in vivo Untersuchungen und in vitro Experimenten ermöglichte die Identifizierung zahlreicher Proteine, die am Replikationszyklus von M13 beteiligt sind. Bisher war es jedoch nur gelungen, die SS nach RF Umwandlung in vitro nachzuvollziehen und damit alle beteiligten Wirts-Proteine sowie deren physiologische Rolle eindeutig zu identifizieren. Es waren dies im einzelnen die E.coli RNA-Polymerase, DNA-Polymerase I, DNA-Polymerase III Holoenzym, DNA-Ligase sowie E.coli HD-Protein. Letzteres gehört, wie das M13 Gen 5-Protein, zur Gruppe der sogenannten "helix destabilising proteins". Diese Proteine sorgen für das enzymatische Aufschmelzen doppelsträngiger DNA bzw. doppelsträngiger DNA Bereiche (loops) in der SS-DNA und schaffen dadurch die, für die DNA-Polymerase III-Aktivität erforderliche strukturelle Voraussetzung.

Die Untersuchung der RF-Replikation in vitro, beispielsweise in Extrakten aus M13-infizierten Zellen, hätte ähnlich präzise Aussagen über den zweiten Replikationsschritt von M13 ermöglicht, wie dies bereits für die SS in RF Umwandlung geschehen ist. Solch ein komplementierbares System zu entwickeln war bisher jedoch wegen einer zu starken Ausverdünnung essentieller Proteine mißglückt. Des weiteren war eine Beteiligung der E.coli Membran an der M13 Replikation diskutiert worden, deren Fehlen im löslichen System ebenfalls ein Scheitern der Versuche hätte begründen können:

Wie sich nun jedoch gezeigt hat, war ausschließlich der Verdünnungsfaktor für dieses Scheitern der bisherigen Anstrengungen die Ursache gewesen.

Die Konzentrierung von Extrakten aus M13 am5 infizierten Zellen auf Membranfolien unter Zugabe von E.coli HD-Protein bzw. M13 Gen 5-Protein, welche anschließend auf kleine Tropfen (25 µl) des geeigneten Inkubationsgemisches transferiert wurden, erlaubte eine effiziente Replikation der endogenen, phagenspezifischen DNA.

Durch die zur Infektion verwendeten M13 am5 Mutanten und das damit verbundene Fehlen eines funktionsfähigen Gen 5 Proteins wurde der Eintritt in die Einzelstrangsynthese unterbunden, d.h., das angestrebte Ziel, die RF-Replikation selektiv untersuchen zu können, war damit realisiert. Auch erlaubte die starke Konzentrierung, mit äußerst geringen Extraktmengen (3 µl/Ansatz) arbeiten zu können und trotzdem eine signifikante Inkorporation ^{3}H-markierter Nukleosidmonophosphate in TCA-fällbares Material zu erzielen. Vorversuche erbrachten auf dem Cellophanfoliensystem eine Einbaurate von 64 pmol/min.

Eine wichtige, weil rasche Methode zur Charakterisierung von Syntheseschritten bot der Einsatz spezifischer Hemmer der DNA-Replikation. Einerseits konnten die, aus in vivo Experimenten bekannten Hemmeffekte bestätigt werden und zum anderen wurde bewiesen, daß die Verwendung von Novobiocin als hochspezifischer Hemmer der semikonservativen DNA-Replikation gerechtfertigt war. Es hatte auf die ATP-abhängige, UV-induzierte Reparatursynthese in Toluol-behandelten Zellen keinerlei Effekt.
Nachdem sich bei der Kontrolle einiger Substrat-Optima gezeigt hatte, daß die Versuchsbedingungen günstig gewählt worden waren, war der nächste Schritt die Analyse der Syntheseprodukte mit Hilfe verschiedener Zentrifugationsmethoden. Es mußte der Nachweis erbracht werden, daß es sich bei den beobachteten Einbauten tatsächlich um eine Replikation der endogenen RF-Moleküle gehandelt hatte.
Die Produktanalyse durch Sedimentationszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten deutete darauf hin, daß das angebotene, radioaktiv markierte Substrat zum größten Teil in intakte RFI-Moleküle eingebaut worden war. Nur ein geringer Teil des Materials sedimentierte als lineare, einzelsträngige DNA, welche aus der Alkalidenaturierung von neusynthetisierten, offen zirkulären RF II Molekülen resultieren mußte.

Eine Bestätigung hierfür wurde durch die Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-EtBr-Gradienten gewonnen. ^{3}H-dTTP war durch BrdUTP ersetzt, als radioaktive Markierung ^{3}H-dGTP verwendet worden. Der weitaus größte Teil des Materials bandierte in zwei gleich hohen Radioaktivitätsgipfeln bei Hybriddichte, wobei entweder der Viralstrang (hl) oder der Komplementärstrang (lh) neusynthetisiert und somit dichtemarkiert war. Ein nicht unbedeutender Anteil der Markierung fand sich in der Position vollschwerer (hh) Doppelstrang-DNA. Daraus wurde deutlich, daß das in vitro System nicht nur die endogene (ll), unmarkierte DNA, sondern auch die neusynthetisierten Hybridmoleküle als Matritze repliziert hatte. Dies wiederum bedeutete, daß mindestens zwei Replikationsrunden durchlaufen worden waren. Zur Unterstützung dieser Aussage wurde ein weiterer Ansatz inkubiert, dessen Reaktionsprodukte mit Hilfe der Gleichgewichtszentrifugation in neutralen CsCl-EtBr-Gradienten gereinigt wurden. Die Fraktionen, welche die RFI DNA enthielten, wurden gesammelt und nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease Hind II durch Sedimentationszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten analysiert. Während ursprünglich, d.h. vor Hind II Verdau, ca. 80 % der Radioaktivität in der Position doppelsträngiger M13 RFI DNA erschienen waren, verschwand der RFI-Gipfel im alkalischen Sedimentationslauf nun völlig. Die gesamte Radioaktivität erschien im Bereich einzelsträngiger DNA, wie es für die Form III Moleküle, einer doppelsträngige Form, nach Alkalidenaturierung zu erwarten war. Die endgültige Bestätigung für eine echte RF-Replikation ergab die Produktanalyse durch die Gleichgewichtszentrifugation in alkalischen CsCl-Gradienten. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten von Viralstrang-DNA (1.763 gr/ml) und Komplementärstrang-DNA (1.748 gr/ml) wurde die Auftrennung beider Stränge im Gradienten ermöglicht und der Nachweis erbracht, daß beide Stränge markiert, d.h. repliziert worden waren.

Rifampicin blockiert präferentiell die Komplementärstrangsynthese von M13. Diese, aus in vivo Versuchen hergeleitete Aussage, konnte durch entsprechende Experimente im Cellophanfoliensystem bestätigt werden (3.5.7.). Auffällig war jedoch, daß der Einbau in Gegenwart von Rifampicin zu mehr als 50 % gehemmt wurde (Tabelle 4). Daraus muß geschlossen werden, daß zusätzliche, möglicherweise sekundäre Effekte dieses Hemmers auf die Viralstrangsynthese gerichtet sind.

Streptolydigin hemmte die Viralstransynthese deutlich stärker als Rifampicin, einen ähnlichen Effekt wie Rifampicin auf die RF-Replikation hatte es jedoch erst bei 10-fach höheren Dosen. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß für die Wirkung von Streptolydigin Sekundärstrukturen der DNA erforderlich sind und die an einer einzelsträngigen Matritze ablaufende RNA-Synthese nur sehr schwer gehemmt werden kann.

Wie sich im folgenden herausstellte, war die Verwendung von Helix-destabilisierenden Proteinen von großem Nutzen:
Erst durch deren Einsatz wurde erreicht, die M13 RF-Replikation bzw. Einzelstrangsynthese voneinander völlig getrennt in Rohextrakten untersuchen zu können. Während das M13 Gen 5-Protein selektiv die Komplementärstrangsynthese blockierte, wurde durch das E.coli HD-Protein, in einem breiten Konzentrationsbereich (bis 100 µg/ml) die Synthese beider Stränge stark stimuliert. Erstaunlicherweise stimulierte auch das Gen 5-Protein die in vitro DNA-Synthese, wenn seine Konzentration 40 µg/ml nicht überschritt. Dieser stimulierende Effekt des Gen 5-Proteins, sowohl auf die RF-Replikation (3.6.2.) läßt vermuten, daß es nicht nur für das Umschalten auf Einzelstrangsynthese verantwortlich ist, sondern auch bei der RF-Replikation eine zusätzliche, positive Rolle spielt. Möglicherweise verdrängt es das für die RF-Replikation essentielle E.coli HD-Protein kompetitiv von der Matritze, wodurch eine raschere Wiederverwendung am Replikationspunkt und somit höhere Syntheserate bewirkt werden. Wie die Analyse der in beiden in vitro Systemen synthetisierten Produkte ergab, wurden mindestens zwei Replikationsrunden in Gegenwart von HD-Protein durchlaufen: Demonstriert durch das Erscheinen eines Radioaktivitätsgipfels im Bereich vollschwerer (hh) RF-Moleküle bei der Gleichgewichtszentrifugation. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß zugesetzte exogene (^{32}P-markierte) RFI DNA effizient repliziert wurde. Dies bedeutet, daß nicht in erster Linie nur bereits vorhandene Replikationsintermediate zu Ende repliziert, sondern gleichermaßen neue Replikationsrunden initiiert wurden.

1. Alle, sowohl im Cellophanfoliensystem als auch im Rohextrakt durchgeführten Experimente bestätigten nach und nach, daß eine effiziente M13 RF-Replikation in vitro möglich ist.

2. In Anwesenheit von E.coli HD-Protein bzw. HD-Protein und M13 Gen 5-Protein konnten einerseits die Effekte der beiden Proteine studiert, andererseits RF-Replikation und Einzelstrangsynthese voneinander

völlig getrennt untersucht werden.

3. Ferner hat man zwei Systeme in die Hand bekommen, in denen durch Komplementation entsprechender Extrakte die Isolierung und Charakterisierung der an der M13 Replikation beteiligten E.coli und M13-Proteine ermöglicht wird.
   Dies gilt vor allem für die Reinigung des M13 Gen 2-Proteins, die bisher nur wegen des Fehlens eines solchen in vitro Systems gescheitert war.

4. Da das verwendete in vitro System (Rohextrakt) zur Initiation neuer Replikationsrunden fähig war, wurde zugleich gezeigt, daß es alle Replikationsproteine beinhaltete und somit die Beteiligung der E.coli Membran an der RF-Replikation und Einzelstrangsynthese ausgeschlossen werden kann.

5. Literaturverzeichnis

Alberts, B. and Sternglanz, R. (1977) Nature (Lond.) 269, 655

Alberts, B., Freiy, L. and Delius H. (1972)J.Mol.Biol. 68, 139

Barbour, S.D. (1967) J.Mol.Biol. 28, 373

Ben-Hamida, F. and Gros, F. (1971) Biochimie 53, 71

Berkowitz, S.A. and Day, L.A. (1974) Biochem.13,4825

Bouché, J.-P., Zechel, K. and Kornberg A. (1975) J.Biol.Chem. 250,5995

Brutlag, D., Schekman, R. and Kornberg A. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2826

Cairns, J. (1963) J.Mol.Biol. 6, 208

Chen, J. and Ray, D.S. (1976) submitted for publication

Cooper, P.K. and Hanawalt, P.C. (1972) J.Mol. Biol. 67, 1

Cozzarelli, N.R. (1977) Ann.Rev.Biochem. 46, 641

De Luria, P. and Cairns, J. (1969) Nature 224, 1164

Denhardt, D.T. (1975) CRC Crit.Rev.Microbiol. 4, 161

Duckworth, D.H. (1976) Bact. Reviews 40, 793

Eisenberg, S., Scott, J.F. and Kornberg A. (1976)
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 1594

Eisenberg, S., Scott, J.F. and Kornberg A. (1976a)
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 3151

Fidanian, H.M. and Ray, D.S. (1972) J.Mol. Biol. 72, 51

Fidanian, H.M. and Ray, D.S. (1974) J.Mol. Biol. 83, 63

Francke, B. and Ray, D.S. (1971) J.Mol. Biol. 61, 565

Francke, B. and Ray, D.S. (1972) J.Mol. Biol. 69, 475

Fukuda, A. and Sinsheimer, R.L. (1976) J.Virol. 17, 776

Geider, K. and Kornberg, A. (1974) J.Biol. Chem. 249, 3999

Gellert, M., O'Dea, M.H., Itoh, T. and Tomizawa, J.-I.(1976)
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 4474

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H. and Nash, H.A. (1976a)
Proc. in press

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Itoh, T. and
Tomizawa, J.-I. (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 4772

Gesteland, R.F. (1966) J.Mol. Biol. 16, 67

Gilbert, W. and Dressler, D. (1968), Cold Spring Harbour
Symp. Quant. Biol. XXXII, 473

Goldberg, J.H. and Friedman, P.A. (1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 775
Grandis, A.S. and Webster, R.E. (1973) Virology 55, 14
Gros, F., Gallant, J., Weisberg, R. and Cashel, M. (1967)
J.Mol. Biol. 25, 555
Hofschneider, P.H. (1963) Z. Naturforschg. 18b, 203
Hohn, B., Lechner, H. and Marvin, D.A. (1971) J.Mol. Biol. 56, 143
Huberman, J.A., Kornberg, A. and Alberts, B. (1971)
J.Mol. Biol. 62, 39
Imae, Y. and Okazaki, R. J. Virology 19, 435 (1976)
Imae, Y. and Okazaki, R. (1976a) J. Virol. 19, 765
Jacobson, A. (1972),J. Virology 10, 835
Jazwinsky, S.M., Marco. R. and Kornberg, A. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 205
Kessler-Liebscher, B.E. and Staudenbauer, W.L. (1976),
Eur.J.Biochem. 70, 523
Kessler-Liebscher, B.E. (1977) Dissertation
Kornberg A. (1974), W.H. Freeman and Company, San Francisco
Maaloe, O. and Hanawalt, P.C. (1961), J.Mol. Biol. 3, 144
Marco, R., Jazwinski, S.M. and Kornberg, A. (1974)
Virology 62, 209
Marians, K.J., Ikeda, J.E., Schlagman, S. and Hurwitz, J. (1977),
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 1965
Marvin, D. and Hohn, B. (1969) Bact. Rev. 33, 172
Masker, W.E. and Hanawalt, P.C. (1973), Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 129
Masker, W.E. and Hanawalt, P.C. (1973a), Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 129
Masker, W.E., Hanawalt, P.C. and Shizuya, H. (1973b)
Nature New Biol. 244, 242
Masker, W.E. and Hanawalt, P.C. (1974), J.Mol. Biol. 88, 12
Masker, W.E. and Richardson, C.C. (1976), J.Mol. Biol. 100, 543
Masker, W.E. and Richardson, C.C. (1976a), J.Mol. Biol. 100, 557
Mazur, B.J. and Zinder, N.D. (1975), Virology 68, 490
Mazur, B.J. and Model, P. (1973), J.Mol. Biol. 78, 285
Mc.Henry, C. and Kornberg A. (1977) J.Biol. Chem. 252, 6478
Meselson, M. and Stahl, F.W. (1958) Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 44, 671
Miller, J. (1972) Cold Spring Harbour Laboratory
Mitra, S. and Stallions, D.R. (1973) Virology 52, 417

Mordoh, J., Hirota, Y. and Jacob, F. (1970), Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 773

Moses, R.E. and Richardson, C.C. (1970), Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 674

Oey, J.L. and Knippers, R. (1972) J.Mol.Biol. 68, 125

Olson, W.L., Staudenbauer, W.L. and Hofschneider P.H. (1972), Proc. Acad. Nat. Sci. 69, 2570

Pratt, D., Tzagoloff, H. and Erdahl, W.S. (1966) Virology 30, 397

Pratt, D. and Erdahl, W.S. (1968) J.Mol.Biol. 37, 181

Pratt, D., Tzagoloff, H. and Beaudouin, J. (1969) Virology 39, 42

Primrose, S.B., Brown, L.R. and Dowell, C.E. (1968) J. Virol. 2, 1308

Rama Reddy, G.V., Goulian, M. and Hendler, S.S. (1971) Nature New Biol. 234, 286

Ray, D.S., Bscheider, H.P. and Hofschneider, H.P. (1966) J. Mol. Biol. 21, 473

Ray, D.S., Preuss, A. and Hofschneider H.P. (1966a) J. Mol. Biol. 21, 485

Ray, D.S. (1969), J. Mol. Biol. 43, 631

Ray, D.S., Dueber, J. and Suggs, S. (1975), J.Virol. 16, 348

Ryan, M.J. and Wells, R.D. (1976), Biochemistry 15, 3778

Palstrom, J.S. and Pratt, D. (1971), J. Mol. Biol 61, 489

Schaller, H., Otto, B., Nüsslein, V., Huf, J., Herrmann, R. and Bonkoeffer, F. (1972), J.Mol. Biol. 63, 183

Schekman, R., Wickner W.T., Westergaard, O., Brutlag, D., Geider, K., Bertsch, L.L. and Kornberg, A. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2691

Schneck, P.K., Staudenbauer, W.L. and Hofschneider, P.H. (1973), Eur.J.Biochem. 38, 130

Schneck, P.K., Staudenbauer, W.L. and Hofschneider, P.H. (1975), Nucl. Azid. Res. 3, 599

Scott, J.F., Eisenberg, S., Bertsch, L.L. and Kornberg, A. (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 193

Shen, C.-K.J. and Hearst, J.E. (1976), Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2649

Sigal, N., Delius, H., Kornberg, T., Gefter, M.L. and Alberts, B. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3537

Simon, T.S., Masker, W.E. and Hanawalt, P.C. (1974), Biochim. Biophys. Acta 349, 271

Smilowitz, H., Lodish, H. and Robbins, P.W. (1971) J. Virol. 7, 776

Stegen, S. and Hofschneider, P.H. (1970) J.Mol.Biol. 48, 361

Staudenbauer, W.L. and Hofschneider, P.H. (1972), Eur.J. Biochem. 30, 403

Staudenbauer, W.L. and Hofschneider, P.H. (1972a), Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 1634

Staudenbauer, W.L., Olson, W.L. and Hofschneider, P.H. (1973), Eur. J. Biochem. 32, 247

Staudenbauer, W.L. and Hofschneider, P.H. (1973a) BBRC 54, 578

Staudenbauer, W.L. (1974) Eur.J. Biochem. 49, 249

Staudenbauer, W.L. (1975) J.Mol.Biol. 96, 201

Staudenbauer, W.L. (1976) Eur.J. Biochem. 62, 491

Staudenbauer, W.L. (1976a) Molec. Gen.Genet. 145, 273

Stone, A.B. (1970), J.Mol. Biol. 47, 215

Studier, W. (1965), J.Mol. Biol. 11, 373

Sugino, A., Peebles, C.L., Kreuzer, K.N. and Cozzarelli, N.R. (1977) Prol. Nat. Acad. Sci. USA 74, 4767

Sumida-Yasumoto, C., Yudelevich, A. and Hurwitz, J. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 1887

Sumida-Yasumoto, C. and Hurwitz, J. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 4195

Takanami, M., Okamoto, T., Sugimoto, K. and Sugisaki, H. (1975), J.Mol. Biol. 95, 21

Tanaka, T. and Weisblum, B. (1975), J. Bact. 121, 345

Van den Hondel, C.A. and Schoenmakers, J.G.G., (1975), Mol. Biol. Rep. 1, 41

Van den Hondel, C.A., Pennings, L. and Schoenmakers, J.G.G. (1976), Eur. J. Biochem. 68, 55

Watanabe, I., Kihara, H.K. and Furuse, K. (1967), Proc. Jap. Acad. 43, 768

Wehrli, W. and Staehelin, M. (1971) Bact. Rev. 35, 290

Westergaard, O., Brutlag, D. and Kornberg, A. (1973), J. Biol. Chem. 248, 1361

Wickner, W., Brutlag, D., Schekman, R. and Kornberg, A. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. 69, 965

Wickner, W., Brutlag, D. and Kornberg, A. (1972a), Fed. Proc. 31, 441

Wickner, W., Schekman, R., Geider, K. and Kornberg, A. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1764

Wickner, W. and Kornberg, A. (1974), J.Biol. Chem. 249, 6244

Wirtz, A. and Hofschneider, P.H. (1970), Eur.J.Biochem. 17, 141

Yamamoto, K.R. and Alberts, B.M. (1970), Virology 40, 734

Zinder, N.D. and Cooper, S. (1964), Virology 23, 152

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, von Mitteln und für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit. Ferner habe ich zu danken für die großzügige Bereitschaft, mir vor Abschluß der Dissertation den beruflichen Wechsel wesentlich zu erleichtern.

Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz danke ich für die bereitwillige Vertretung der Arbeit im Fachbereich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. L. Staudenbauer. Er war mir durch sein außerordentlich hohes Maß an wissenschaftlichem Engagement, durch seine nie ermüdende Bereitschaft zur Diskussion und durch seine wertvollen experimentellen Ratschläge eine unersetzliche Hilfe.

Herrn Dr. B. van Dorp möchte ich herzlich danken für die anregenden Diskussionen und die Reinigung des M13 Gen 5-Proteins sowie des E.coli HD-Proteins.

Frau I. Scholz danke ich für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Herrn M. Wissinger danke ich für die äußerst rasche und gewissenhafte Herstellung bzw. Reparatur zahlreicher Apparaturen.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für das gewährte Promotionsstipendium.

Lebenslauf

Am 10. April 1946 wurde ich als erstes Kind des Dipl.Ing. Architekt Ernst Schneck und seiner Ehefrau Frieda, geborene Achhammer, in München geboren.

Ab September 1952 besuchte ich zunächst in Landshut, ab 1955 in München die Volksschule. Die bestandene Aufnahmeprüfung erlaubte mir den Obertritt in das Gymnasium. Die ersten beiden Jahre besuchte ich das Ludwigs-Gymnasium, wechselte anschließend in das heutige Oscar-von Miller-Gymnasium und legte dort im Sommer 1966 die Reifeprüfung ab.

Von Oktober 1966 bis zum März 1968 leistete ich in Traunstein den 18-monatigen Wehrdienst ab.

Mit dem Sommersemester 1968 begann ich das Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
Im Wintersemester 1970/71 legte ich die Diplomvorprüfung ab, im Sommersemester 1974 die Diplomhauptprüfung.
Ab Februar 1972 fertigte ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung von Herrn Professor Dr. Dr. Hofschneider meine Diplomarbeit und anschließend die vorliegende Dissertation an.